



Desenvolvimento de métodos analíticos avançados no estudo dos poluentes emergentes

Daniel Fernando Rodrigues de Queirós

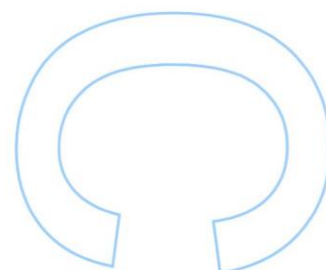
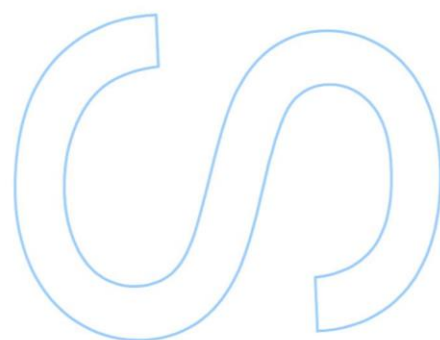
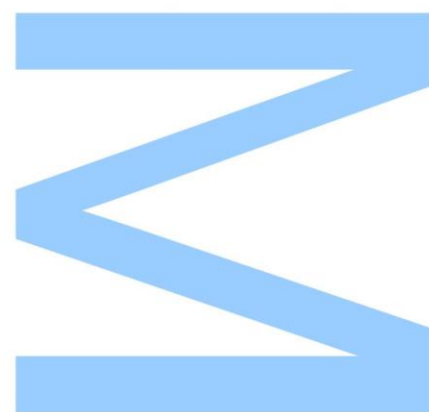
Mestrado em Química
Departamento de Química
2017

Orientador

Maria de Fátima Alpendurada,
Presidente da Direção,
Instituto da Água da Região Norte

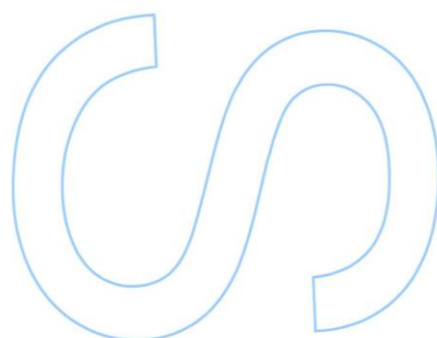
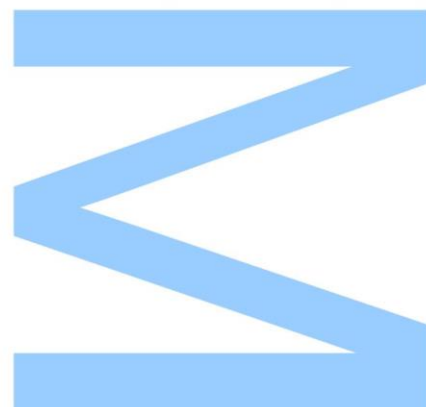
Orientador

Cosme Moura,
Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,
Porto, ____/____/____



*"Practice doesn't make perfect,
practice makes permanent."*

Larry Gelwix

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. A todas elas quero expressar a minha sincera gratidão.

À Prof^a. Doutora Maria de Fátima Alpendurada, orientadora deste trabalho e Presidente da Direção do IAREN, quero agradecer pela oportunidade da realização deste estágio e por todo o apoio científico que me deu ao longo da realização do presente trabalho. A sua exigência e espírito crítico foram para mim um forte estímulo e contributo no desenvolvimento de conhecimentos ao longo deste período.

Ao Prof. Doutor Cosme Moura, orientador da FCUP, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade ao longo destes dias de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação e revisão deste relatório.

À Ana Guimarães, Gestora de Qualidade do IAREN, pela supervisão, orientação, pelo conhecimento transmitido, pelo inestimável apoio, empenho e dedicação dispensados ao longo de todo o estágio.

À Odília Matos, pelo acompanhamento, conhecimentos transmitidos e paciência durante os primeiros períodos de estágio.

Ao Romeu Avó, pelas sugestões feitas durante a elaboração do método analítico.

À Odília, Sara, Marina e Diana pela vossa companhia e amizade.

A todos os restantes colaboradores do IAREN – Andreia, Vera, Lurdes, Anabela, Marta L., Marta T. e Cristiano - pelo acolhimento, bom ambiente e apoio durante o período de estágio.

À Ana Lima, Bárbara Magalhães e Ana Rodrigues pela amizade durante os anos da FCUP.

E acima de todos, à minha irmã e aos meus pais.

Resumo

O presente trabalho consistiu na implementação e validação de um método de ensaio para a identificação e quantificação de ácidos haloacéticos (HAAs) em águas de consumo humano.

Em termos de legislação, a *US EPA (United States Environmental Protection Agency)* impõe que o somatório das concentrações de 5HAAs5 (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA) não deverá exceder o limite de $60 \mu\text{g.L}^{-1}$. A Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO*) dá como valores de referência para o MCAA, DCAA e TCAA os limites de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, respetivamente. A Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) dita como valor de referência para o somatório de concentrações de 3HAAs (MCAA, DCAA, TCAA), $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ [3-5].

Para a determinação destes compostos foi usado o método que combina a cromatografia líquida de ultra eficiência com a espectroscopia de massa (UPLC-ESI-MS/MS).

Procedeu-se à otimização das condições operacionais de funcionamento do espectrómetro de massa, em particular das condições favoráveis à formação do ião precursor para cada HAA, dos parâmetros relacionados com a formação dos iões produto característicos de cada composto, de modo a definir as transições MRM de quantificação e qualificação características de cada HAA.

Após a conclusão do estudo anterior, procedeu-se à otimização das condições operacionais da separação cromatográfica com o intuito de se obter a seletividade adequada à separação, o máximo de sensibilidade e resolução para todos os HAAs, no menor tempo possível.

Concluídos os estudos de otimização, procedeu-se à validação do método analítico dos principais parâmetros de mérito, nomeadamente a linearidade, a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a exatidão, através da aplicação de diversos testes estatísticos recomendados para aquele fim.

Após a validação, o método de análise foi aplicado em amostras de água da rede pública. Os resultados obtidos demonstram que a presença de HAAs é vestigial para a maioria dos analitos em estudo com exceção do TCAA que apresentou concentrações entre $7,19 - 8,12 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavras chave: água de consumo humano, ácidos haloacéticos, UPLC-ESI-MS/MS

Abstract

The present work consisted in the implementation and validation of a test method for the identification and quantification of haloacetic acids (HAAs) in drinking water.

In terms of legislation, the *US EPA* requires that the sum of the concentrations of 5HAAs (MCA, DCA, TCA, MBA and DBA) should not exceed the limit of 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The World Health Organization (WHO) gives the reference values for the MCAA, DCAA and TCAA the limits of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The Water and Waste Service Regulatory Agency (ERSAR) is the reference value for the sum of concentrations of 3HAAs (MCA, DCA, TCA), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [3-5].

For the determination of these compounds the method that combines ultra-high performance liquid chromatography with mass spectroscopy (UPLC-ESI-MS / MS) was used.

The operating conditions of the mass spectrometer were optimized, in particular the conditions favorable to the formation of the precursor ion for each HAA, of the parameters related to the formation of the product ions characteristic of each compound, in order to define the MRM quantification and qualification characteristics of each HAA.

After the conclusion of the previous study, the operational conditions of the chromatographic separation were optimized in order to obtain the appropriate separation selectivity, maximum sensitivity and resolution for all HAAs, in the shortest possible time.

Once the optimization studies were completed, the analytical method was validated for the main merit parameters, namely linearity, work range, analytical thresholds, precision and accuracy, through the application of several statistical tests recommended for that purpose.

After validation, the analysis method was applied to samples of water from the public network. The results show that the presence of HAAs is trace for most of the analytes under study with the exception of TCAA that presented concentrations between 7.19 - 8.12 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Keywords: water for human consumption, haloacetic acids, UPLC-ESI-MS/MS

Índice

Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Âmbito do trabalho.....	1
1.2. Entidade de acolhimento	2
2. Tratamento da Água para Consumo	4
2.1. Armazenamento.....	4
2.2. Gradagem	4
2.3. Microtamização.....	5
2.4. Pré-oxidação.....	5
2.5. Arejamento.....	5
2.6. Coagulação/Floculação	6
2.7. Amaciamento	6
2.8. Sedimentação	7
2.9. Filtração	7
2.10. Correção do pH	7
2.11. Desinfecção.....	8
2.12. Subprodutos da desinfecção	12
2.12.1. Formação de subprodutos	14
3.1. Mecanismo de formação	17
3.2. Propriedades.....	17
3.3. Toxicologia	18
3.4. Legislação.....	19
3.4.1. Outros estudos relacionados.....	21
4. Método Instrumental	23
4.1. Cromatografia	23
4.1.1. Nota introdutória	23
4.1.2. Princípios teóricos	23
4.1.3. Cromatografia líquida	27
4.1.4. Cromatografia Líquida de Ultra Resolução.....	28
4.2. Espectrometria de massa.....	31
4.2.1. Fonte de ionização	32
4.2.2. Analisador de massas	33

5.	Validação.....	36
5.1.	Seletividade e Especificidade.....	37
5.1.1.	Falsos positivos e falsos negativos.....	38
5.2.	Quantificação.....	39
5.2.1.	Curva de calibração.....	39
5.2.2.	Limiares analíticos.....	41
5.3.	Sensibilidade.....	42
5.4.	Precisão.....	43
5.4.1.	Repetibilidade.....	43
5.4.2.	Reprodutibilidade.....	43
5.4.3.	Precisão intermédia.....	44
5.4.4.	Robustez.....	44
5.5.	Exatidão.....	45
5.5.1.	Ensaio interlaboratoriais.....	45
5.5.2.	Ensaio de recuperação.....	45
6.1.	Equipamento.....	47
6.2.	Material.....	47
6.3.	Reagentes.....	48
6.4.	Preparação de soluções.....	48
6.4.1.	Solventes e fases móveis para a cromatografia.....	48
6.4.2.	Soluções padrão.....	48
6.5.	Método analítico.....	53
6.5.1.	Otimização das condições do espectrómetro de massas.....	53
6.5.2.	Otimização das condições cromatográficas.....	55
6.5.3.	Ensaio de recuperação e análise de amostras reais.....	56
7.	Apresentação e Discussão dos resultados.....	57
7.1.	Otimização das condições operacionais do espectrómetro de massa.....	57
7.1.1.	Voltagem aplicada ao capilar.....	57
7.1.2.	Voltagem do cone de amostragem.....	58
7.1.3.	Energia de colisão.....	59
7.2.	Condições operacionais da separação cromatográfica.....	63
7.2.1.	Composição da fase móvel.....	64
7.2.2.	Períodos de monitorização dos fragmentos referentes aos diferentes HAAs	65
7.2.3.	Outras condições.....	66
7.3.	Validação do método analítico.....	68

7.3.1.	Linearidade e gama de trabalho	68
7.3.2.	Limites analíticos	75
7.3.3.	Razão MRM1/MRM2	77
7.3.4.	Precisão	78
7.4.	Análise de amostras e ensaios de recuperação	79
8.	Conclusões e perspetivas futuras	88
	Referências Bibliográficas	90

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Fórmula química e abreviatura dos ácidos haloacéticos que se formam durante a desinfecção da água por ação do cloro.	16
Tabela 2 – Parâmetros e fórmula química dos ácidos haloacéticos estudados (adaptado de [34]).	18
Tabela 3 - Massas pesadas e respetiva concentração das soluções intermédias dos ácidos tricloroacético e dicloroacético.	49
Tabela 4- Volumes das soluções padrão de concentração intermédia usados na preparação das soluções padrão para infusão dos 5 HAAs.	50
Tabela 5- Volumes das soluções padrão intermédias usados na preparação da solução padrão conjunta.	50
Tabela 6 - Volumes pipetados para a preparação da solução padrão conjunta intermédia	51
Tabela 7- Detalhes experimentais da preparação das soluções padrão dos haloácidos usadas no traçado da reta de calibração.	51
Tabela 8- Níveis de fortificação das soluções usadas nos ensaios de recuperação. ...	52
Tabela 9 - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.	54
Tabela 10– Resumo dos resultados da otimização da voltagem de cone.	59
Tabela 11– Resumo das condições ótimas do espetrómetro de massas para cada HAA em estudo.	62
Tabela 12- Condições ótimas de funcionamento do espetrómetro de massa usadas pelo IAREN na determinação dos ácidos HAAs [6].	63
Tabela 13 - Períodos de monitorização do detetor definidas para cada composto.	65
Tabela 14 – Tempos de retenção característicos dos 5 HAAs para as condições impostas.	67
Tabela 15 - Outras condições cromatográficas.	68
Tabela 16– Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação para cada HAA.	69
Tabela 17– Resultados do teste de Mandel	71
Tabela 18– Resultado do teste da Homogeneidade de variâncias.	72
Tabela 19– Resultado da análise de resíduos para os 5HAAs.	73
Tabela 20 – Resultados dos testes das áreas normalizadas e Rikilt para os 5HAAs. .	75
Tabela 21 – Avaliação dos limiares analíticos para os 5HAAs usando dois métodos de cálculo.	76
Tabela 22– Razão MRM1/MRM2 para a gama de trabalho dos 5HAAs	77
Tabela 23 – Repetibilidade para o estudo da precisão com n=10	78

Tabela 24– Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da rede pública.....	80
Tabela 25- Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da rede pública com tiosulfato de sódio.	81
Tabela 26 - Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da trede pública com ácido ascórbico	82
Tabela 27– Resultado da análise de variâncias para o primeiro nível de fortificação do ensaio com o MCA.	83
Tabela 28 – Resultado da análise de variâncias para o segundo nível de fortificação do ensaio com o MCA.	83
Tabela 29– Resultado da análise de variâncias para o terceiro nível de fortificação do ensaio com o MCA.	83
Tabela 30– Resultado da análise de variância de dois fatores, com repetição, entre a amostra sem e com tratamento com tiosulfato de sódio para os níveis de fortificação 1 e 2 do ensaio com o MCA.	84
Tabela 31– Resultado da análise de variância de dois fatores, com repetição, entre a amostra sem e com tratamento com ácido ascórbico para os níveis de fortificação 1 e 2 da análise do MCA.	85
Tabela 32 – Resultados da análise das amostras provenientes de Matosinhos.....	87

Índice de Figuras

Fig. 1 - Logo do IAREN	2
Fig. 2 – Instalações do Instituto da Água da Região Norte (IAREN)[10]	3
Fig. 3 - Distribuição relativa das principais formas químicas de cloro aquoso em função do pH a 25 °C [21].	10
Fig. 4 - Relação do teor de cloro residual com a quantidade de cloro introduzido [12].11	
Fig. 5 - Proporção dos DBP resultantes da cloração da água para consumo humano (adaptado de [24] e [31]).	13
Fig. 6 - Mecanismo de halogenação do ácido acético em meio básico. X=Cl ou Br [33].	17
Fig. 7 - Esquema representativo do processo cromatográfico (adaptado de [46])	24
Fig. 8– Esquema de um HPLC (adaptado de [56])	28
Fig. 9 - Curva de van Deemter para partículas de tamanho 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$ [44].	29
Fig. 10 - Esquema de um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo usado em cromatografia líquida [57].	31
Fig. 11 – Esquema da formação de iões por ESI (adaptado de [55]).	32
Fig. 12 - Esquema de um quadrupolo [57].	33
Fig. 13 - Esquema de um triplo-quadrupolo (adaptado de [55]).	34
Fig. 14- Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da voltagem de capilar (kV) para o ião precursor de cada HAA.	58
Fig. 15– Espectro de massa do ácido monocloroacético em modo Full Scan.	60
Fig. 16– Espectro de massa do ácido dibromoacético em modo Product Ion Scan para a transição 216,9 \rightarrow 172,9.	61
Fig. 17– Cromatogramas registados para diferentes composições de fase móvel aquosa. Solução de ácido acético 0,1 % (à esquerda) e solução de ácido fórmico 0,1 % (à direita).	64
Fig. 18 - Cromatograma dos 5 HAAs com janelas de aquisição definidas.	66
Fig. 19 - Programa da eluição gradiente usado na separação cromatográfica dos HAAs	67
Fig. 20– Reta de calibração do DBA e respetivo coeficiente de correlação	69
Fig. 21 – Representação gráfica da análise de resíduos do DBA.	73
Fig. 22– Representação gráfica do método das áreas normalizadas para o MBA.	74

Lista de Abreviaturas

ANOVA – análise de variâncias
DBA – ácido dibromoacético
DCA – ácido dicloroacético
DPB – subprodutos da desinfecção (disinfection by-products)
ECD – deteção por captura eletrónica
ERSAR – Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos
ESI – ionização por electrospray
ETA – estações de tratamento de água
GC – cromatografia gasosa
HAA – ácido haloacético (haloacetic acid)
HAK - haloacetonas
HAN – haloacetonitrilos
HEPT – prato teórico
HPLC – cromatografia líquida de alta resolução
HSS – high strength sílica
IAREN – Instituto da Água da Região Norte
IC – cromatografia iónica
LD – limite de deteção
LQ – limite de quantificação
MBA – ácido monobromoacético
MCA – ácido monocloroacético
MRM - Multiple Reaction Monitoring
MS – espectrometria de massa
SPE – extração em fase sólida (solid phase extraction)
TBA – ácido tribromoacético
TCA – ácido tricloroacético
THM – trihalometanos
UPLC – cromatografia líquida de ultra-eficiência
US EPA – Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)
UV – ultra-violeta
WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

1. Introdução

1.1. Âmbito do trabalho

O abastecimento de água para consumo humano, assim como o controlo da sua qualidade, é um serviço público essencial ao bem-estar dos cidadãos e à saúde pública. Pode-se afirmar que Portugal se encontra avançado nesta obrigação, cobrindo praticamente a totalidade da população com um serviço adequado de abastecimento. A nível nacional a água para consumo humano apresenta excelente qualidade, com 99% de água segura (ERSAR – 2015), colocando Portugal ao nível dos países mais avançados da União Europeia [1].

A qualidade exigida baseia-se não só na análise de parâmetros físico-químicos como no cumprimento dos valores paramétricos definidos no decreto de Lei 306/2007, obrigando a água a ser isenta de micro-organismos patogénicos. Isto acontece uma vez que a água potável é uma das principais fontes de patogénicos microbianos [18].

O tratamento a que a água destinada ao consumo humano é sujeita, é constituído por vários processos, sendo um deles o da desinfeção. Os agentes desinfetantes mais usados, tais como o cloro e o hipoclorito de sódio, reagem com a matéria orgânica presente na água formando os chamados subprodutos da desinfeção. Alguns destes subprodutos, em particular os trihalometanos (THMs) e os ácidos haloacéticos (HAAs), constituem uma séria ameaça à saúde pública, pelo que é de todo o interesse proceder à monitorização e controlo sistemático daquelas substâncias em águas de abastecimento público [3].

Dada a sua relevância no domínio dos subprodutos da desinfeção da água por cloro, tanto mais que representam o principal grupo de subprodutos halogenados não-voláteis, os ácidos haloacéticos foram os subprodutos seleccionadas para objeto de estudo do presente trabalho.

Em termos de legislação atual, a US EPA tem como valor de referência o limite de $60 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a soma dos 5 principais ácidos haloacéticos (5HAAs): ácido monocloraacético (MCA), ácido dicloraacético (DCA), ácido tricloroacético (TCA), ácido monobromoacético (MBA) e ácido dibromoacético (DBA) [4]. Já a Organização Mundial de Saúde (WHO) indica apenas para três ácidos haloacéticos valores referência com os limites de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o MCA, DCA e TCA, respetivamente [3]. A nível nacional e europeu não existe qualquer legislação que estabeleça um limite para a presença destes compostos, mas a Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e

Resíduos (ERSAR) tem como valor de referência o limite para a soma das concentrações de MCA, DCA e TCA, que é de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ [5].

Os métodos analíticos oficiais de determinação de HAAs como os métodos EPA 552.1, 552.2, 552.3 usam cromatografia gasosa (GC) com deteção por captura de eletrónica (ECD) ou espectrometria de massa (MS) [7-9], mas têm o inconveniente da derivatização prévia dos HAAs devido à natureza ácida, elevada polaridade e baixa volatilidade destes compostos. É habitual a reação de derivatização prolongar-se por um período de 2h, o que torna o tempo do ensaio analítico exageradamente longo e a necessitar da atenção permanente do analista por longos períodos de tempo devido ao fraco nível de automação do tratamento da amostra. Além disso, não se pode excluir a possibilidade ocorrer reações de decomposição térmica e hidrólise de derivados de ésteres metílicos de HAAs no injetor do cromatógrafo [6]. Todas estas desvantagens fazem com que o método de determinação de HAAs por cromatografia gasosa não seja o mais adequado e, por isso mesmo, justificam a procura de métodos alternativos mais expeditos.

Neste trabalho propõe-se o uso da cromatografia líquida de ultra eficiência com a deteção por espetrometria de massa com ionização por *electrospray* (UPLC-ESI-MS/MS), usando uma coluna cromatográfica de fase reversa (HSS T3) para a determinação dos 5HAAs.

1.2. Entidade de acolhimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto da Água da Região Norte (IAREN), no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.



Fig. 1 - Logo do IAREN

O IAREN foi fundado em 27 de Março de 1991, sendo uma Associação sem fins lucrativos, que congrega a Universidade do Porto, Autarquias, Serviços Municipalizados, Administrações Regionais de Saúde e Empresas Privadas. Nasceu na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto onde dispunha de uma área de apenas 80 m^2 . Atualmente, dispõe de novas instalações construídas em Matosinhos, em terreno cedido pela Câmara Municipal de Matosinhos, em direito de superfície, por 50 anos. O suporte financeiro de todos os técnicos que trabalham no IAREN é feito na totalidade pelo Instituto, bem como todas as despesas inerentes ao seu funcionamento.



Fig. 2 – Instalações do Instituto da Água da Região Norte (IAREN)[10]

O IAREN exerce a sua atividade no domínio da qualidade da água com a elaboração de estudos que envolvem metodologias e técnicas inovadoras conseguidas com a utilização de elevada tecnologia e a mobilização de especialistas de reconhecido mérito.

Foi causa primeira do lançamento do IAREN, a necessidade de construir uma estrutura capaz de, a tempo, responder às exigências impostas pela entrada em vigor da legislação comunitária e nacional, no domínio da qualidade da água, atendendo à inexistência de capacidade laboratorial, técnica e estrutural adequadas.

Detentora de inúmeras técnicas analíticas capazes de suportarem a execução dos métodos de ensaio associados à determinação de cerca de 250 parâmetros físico-químicos, nomeadamente: inorgânicos, nos quais se incluem os metais pesados, e orgânicos de síntese: pesticidas (organoclorados, organofosforados, triazinas, ureias, carbamatos, piretróides, entre outros), hidrocarbonetos totais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fenóis, compostos orgânicos voláteis, ftalatos, compostos organometálicos, trihalometanos, ácidos haloacéticos, fragrâncias, resíduos farmacêuticos, estrogénios, dioxinas e furanos, alquilfenóis, bem como, parâmetros microbiológicos, em diversas matrizes ambientais: águas naturais, águas residuais, lamas, solos e sedimentos.

Em 26 de Dezembro de 2006, foi-lhe concedida pelo IPAC o Certificado de acreditação para 165 parâmetros em várias matrizes ambientais. Atualmente o número de parâmetros acreditados é de 197 [10].

2. Tratamento da Água para Consumo

A água potável pode ser obtida diretamente a partir de uma água subterrânea de elevada qualidade ou indiretamente a partir de uma água não potável, posteriormente submetida a tratamentos apropriados nas chamadas Estações de Tratamento de Águas, ETA [12]. Em Portugal, os volumes de água potável proveniente de captações superficiais são superiores aos das captações subterrâneas [13].

O processo de tratamento de água destinada ao consumo humano constitui normalmente um desafio à adaptação operacional das estações de tratamento, uma vez que a qualidade das águas captadas é variável. O conjunto das operações de tratamento, que se designa genericamente por tratamento convencional, é constituído pelas seguintes etapas: armazenamento, gradagem, microtamização, pré-oxidação, arejamento, coagulação/floculação, sedimentação, filtração, outros processos, estabilização e desinfecção final [14].

O tratamento convencional de água para consumo humano deverá permitir que, ao longo das diversas etapas, os fatores de contaminação químicos e microbiológicos sejam reduzidos.

2.1. Armazenamento

A etapa de armazenamento procura evitar variações bruscas na qualidade da água causadas por intempéries, como por exemplo, cheias e seca extrema. Normalmente, a água bruta é bombeada da fonte de captação para grandes reservatórios de armazenamento.

Os benefícios associados ao armazenamento estão relacionados com a redução do nível de turvação e redução de agentes patogénicos por efeito da ação da luz, levando a uma diminuição das substâncias indesejáveis e oxidação das impurezas. Por outro lado, de forma negativa, o armazenamento da água leva à formação de algas [3].

2.2. Gradagem

Antes do início das etapas de tratamento propriamente ditas, a água bruta passa através de uma série de grelhas, que tem como objetivo a remoção de sólidos

grosseiros, evitando assim a obstrução da conduta do respetivo sistema de tratamento [14].

2.3. Microtamização

A etapa de microtamização tem como objetivo a remoção de sólidos finos bem como algas presentes na água. A água passa por uma rede metálica, com dimensões que podem variar entre 0,02 a 0,06 mm, que gira a uma determinada velocidade, de forma a eliminar as algas e outras partículas de dimensão reduzida presentes na água captada [16].

2.4. Pré-oxidação

A etapa de pré-oxidação consiste no primeiro processo químico de tratamento de água, sendo normalmente efetuada imediatamente após a captação de água bruta. Nesta etapa é adicionado um reagente (ozono, dióxido de cloro ou cloro) com o objetivo de degradar a maior parte da matéria orgânica presente na água por oxidação química e ainda inativar os microrganismos patogénicos que possam existir.

De forma a garantir que o processo de oxidação é suficientemente eficaz, a quantidade do agente oxidante utilizado deve ser adicionada em largo excesso [15,16].

2.5. Arejamento

O processo de arejamento é normalmente utilizado em águas que apresentam baixo teor de oxigénio dissolvido, podendo esta etapa ser realizada através da introdução de ar comprimido ou interpondo quedas de água no circuito de arejamento.

Normalmente, a etapa de arejamento assume um papel determinante no tratamento das águas subterrâneas, visto que estas apresentam um nível elevado de metais com baixo grau de oxidação. Os metais, como o ferro e o manganês, são apenas solúveis em água para valores de pH inferior a 6,5 e na ausência de oxigénio. Neste sentido, o arejamento oxida alguns cátions metálicos dos diferentes sais solúveis a formas com maior grau de oxidação e que precipitam sob a forma de hidróxidos por

aumento do pH da água, sendo possível posteriormente a sua remoção na etapa de filtração [16].

2.6. Coagulação/Floculação

Uma água de origem superficial apresenta, normalmente, valores relativamente elevados de turvação, resultado da presença de partículas de natureza coloidal. Estas partículas apresentam normalmente dimensões menores que 10 μm . Estes colóides são habitualmente constituídos por óxidos metálicos, proteínas de grandes dimensões e microrganismos. As partículas finas em suspensão na água, como as partículas de lama e a matéria coloidal em água não assentam durante o processo de sedimentação [17].

O facto das partículas coloidais serem de difícil remoção por ação da gravidade, é necessário recorrer a um agente coagulante, de forma a provocar a desestabilização das partículas coloidais (coagulação) e a consequente agregação em flocos de grandes dimensões (floculação) separáveis por decantação [14]. Os principais coagulantes utilizados são os sais de ferro (cloreto de ferro (III) e sulfato de ferro (III)) e de alumínio (sulfato de alumínio, hidróxido de alumínio e cloreto de alumínio) [17]. A eficácia do processo de coagulação/floculação depende de vários fatores: a qualidade e a natureza do coagulante, alcalinidade da água e a temperatura da água.

A adição de sais de alumínio em águas alcalinas faz com que ocorra a formação dos iões Al^{3+} , que neutralizam as partículas coloidais (negativas) favorecendo assim a sua coagulação e levando à formação de hidróxido de alumínio. Estes compostos são insolúveis levando à formação de precipitados, permitindo assim uma coagulação mais eficiente.

2.7. Amaciamento

O processo de redução da dureza da água designa-se por amaciamento. As águas podem ser classificadas de acordo com o seu teor em carbonato de cálcio: águas muito duras ($\geq 180 \text{ mg.L}^{-1}$), águas duras ($120 - 180 \text{ mg.L}^{-1}$), águas moderadamente duras ($60-120 \text{ mg.L}^{-1}$) e águas macias ($\leq 60 \text{ mg.L}^{-1}$)[3]. O valor da dureza total da água deve estar entre 150 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} de CaCO_3 [17], sendo necessário recorrer ao amaciamento, que consiste na eliminação parcial dos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} sempre que a dureza da água captada ultrapasse aquele limite superior.

O amaciamento pode ser executado por dois processos:

- Adição de um agente precipitante à água (cal, carbonato de sódio ou hidróxido de sódio), promovendo a formação de sais insolúveis de Ca^{2+} e Mg^{2+} e que serão removidos nas etapas seguintes de sedimentação e filtração.
- Permuta iónica usando uma resina permutadora de iões [3].

2.8. Sedimentação

A sedimentação consiste na remoção, por ação da gravidade, dos sedimentos formados nas etapas anteriores. Os sedimentos acumulam-se no fundo dos tanques de sedimentação, formando deste modo as lamas do processo de tratamento [15].

2.9. Filtração

A etapa seguinte consiste na filtração da água proveniente da sedimentação, que permite a remoção de partículas mais pequenas, promovendo a clarificação final da água. De forma a garantir uma remoção eficiente, os filtros são constituídos por camadas de cascalho e areia [17].

2.10. Correção do pH

Ao longo do processo de tratamento de água, podem ocorrer alterações do valor de pH pelo que, sempre que necessário, deverá ser feito o seu ajuste.

Quando as águas apresentam valores baixos de pH estes podem ser corrigidos, normalmente recorrendo a duas alternativas: fazer passar a água por brita calcária, que elimina o dióxido de carbono em excesso e o transforma em anião hidrogenocarbonato. Em alternativa pode-se também adicionar cal ou carbonato de sódio. No caso da água apresentar valores elevados de pH, a sua correção pode ser feita através da recarbonatação (adição de ácido carbónico) ou pela adição de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico [17].

2.11. Desinfecção

Os microrganismos patogénicos não são totalmente eliminados pelos tratamentos físico-químicos e biológicos de uma ETA, mesmo quando a eficiência da estação atinge níveis de tratamento próximos de 99,9%, o que significa que a etapa de desinfecção da água é absolutamente vital para assegurar que quaisquer microrganismos decorrentes de contaminação fecal, ou de qualquer outra fonte, sejam destruídos [3].

Todas as substâncias usadas como desinfetantes no tratamento da água produzem sempre algum tipo de produto secundário. A eficiência do processo de desinfecção é controlada por diversos fatores, nomeadamente: concentração e tipo de desinfetante, tempo de residência, pH da água, temperatura, tipo de microrganismos e respetiva concentração [3].

São várias as substâncias que atuam como desinfetante e cada uma tem as suas vantagens e desvantagens em relação às outras. Os desinfetantes mais usados são o cloro, ozono, dióxido de cloro, cloraminas e a radiação ultravioleta [19].

a) Ozonização

O ozono possui um elevado poder oxidante e é utilizado muitas vezes no processo de tratamento de água, promovendo a oxidação de substâncias orgânicas. O ozono é formado a partir da passagem de ar ou oxigénio por um campo elétrico de alta voltagem, e é adicionado diretamente à água. Para evitar o crescimento bacteriano indesejado no sistema de abastecimento, a ozonização é usada em associação com a filtração biológica ou com carvão ativado, com o objetivo de reduzir a cor, cheiro, sabor e a presença de microrganismos na água [3].

A formação de subprodutos da desinfecção, quando se usa o ozono como agente oxidante, é inferior à quantidade de subprodutos formados no processo de cloração. No entanto, quando o ozono é utilizado em águas que contenham anião brometo, conduz à formação de anião bromato. Este último anião, apresenta propriedades carcinogénicas, o que faz com que a ozonização traga alguns riscos para o consumidor [3].

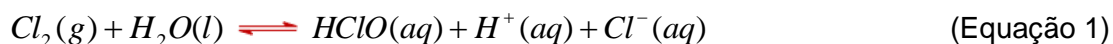
b) Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta, emitida por uma lâmpada de mercúrio de baixa ou média pressão, pode ser utilizada para a inativação de protozoários, bactérias, bacteriófagos, leveduras, vírus, fungos e algas. Quando a radiação UV penetra a parede celular de um microrganismo, a radiação é absorvida pelas proteínas e pelo DNA das células, danificando a estrutura proteica ao ponto de impedir a reprodução das células, o que leva à inatividade do microrganismo. A turvação da água pode inibir a desinfecção com este tipo de radiação [3].

c) Cloragem

Na desinfecção por cloro recorre-se, tipicamente, à utilização de um de três agentes oxidantes: cloro gasoso (Cl_2), hipoclorito de sódio (NaClO), ou hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). A escolha do reagente a utilizar é feita em função da quantidade necessária de desinfetante, das condições existentes no local, da facilidade de operação, das condições de segurança e do custo associado [20].

Quando o cloro é adicionado à água, ocorre a reação de hidrólise, dando origem a formação do ácido hipocloroso [21].



Dependendo do pH da água, ocorre a formação de ClO^- a partir da ionização do HClO , de acordo com a equação química:



Tanto o ácido hipocloroso como o ClO^- podem atuar como desinfetante, embora o ácido seja mais eficaz [21].

Como se pode observar através da Figura 3, as quantidades relativas de HClO e ClO^- variam com o pH.

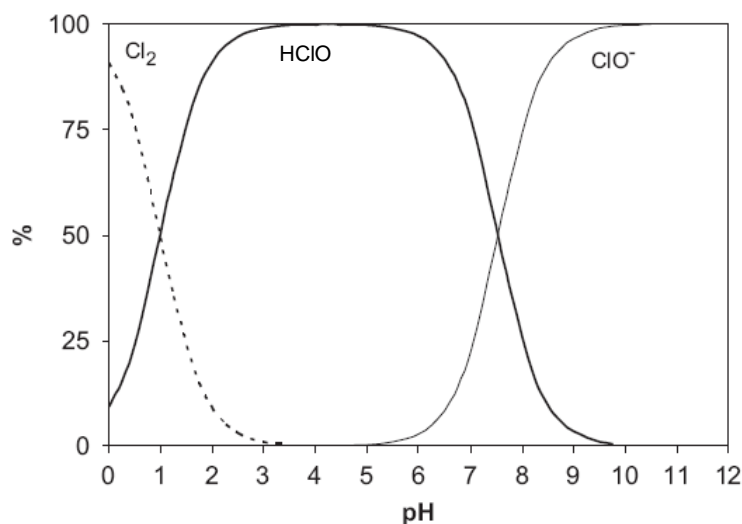
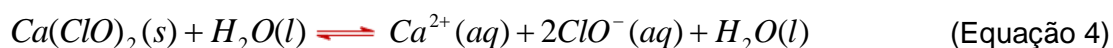


Fig. 3 - Distribuição relativa das principais formas químicas de cloro aquoso em função do pH a 25 °C [21].

Por análise da Figura 3, verifica-se que para pH ácido a presença do ácido hipocloroso é dominante. A um pH superior a 6, a concentração do ácido hipocloroso começa a diminuir e aumenta a concentração do ião hipoclorito. Neste sentido, quanto mais baixo for o pH da água mais eficaz será a desinfecção [21].

O cloro também pode ser adicionado sob a forma de hipoclorito de sódio (NaClO) ou sob a forma de hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂). As equações químicas 3 e 4 traduzem a interação destes compostos com a água.



Quando o cloro é adicionado à água podem ocorrer diferentes reações químicas, pelo que é de extrema importância que os seus mecanismos sejam bem conhecidos.

Na Figura 4, apresenta-se a evolução do teor de cloro residual em função da quantidade de cloro introduzida.

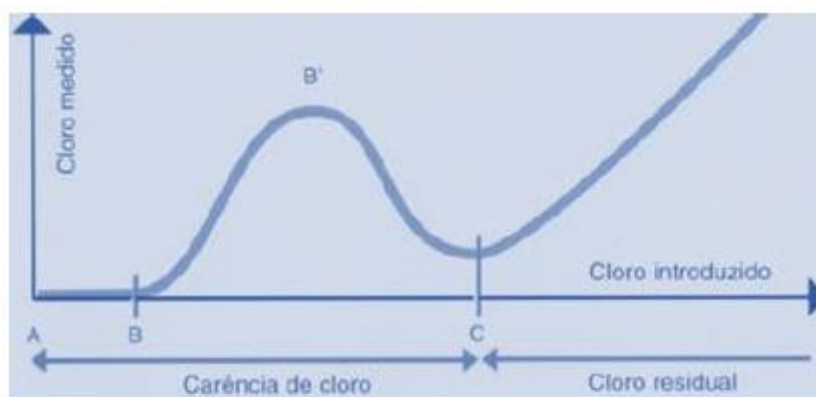
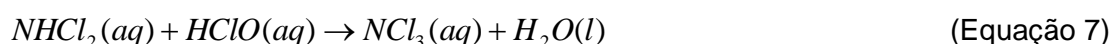
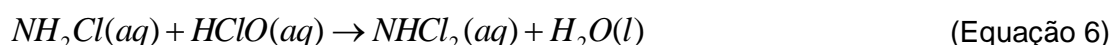
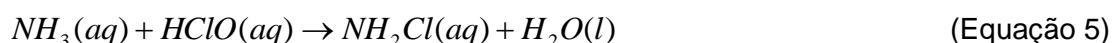


Fig. 4 - Relação do teor de cloro residual com a quantidade de cloro introduzido [12].

Na fase AB, o cloro introduzido é imediatamente consumido pela matéria orgânica, pelo que a quantidade residual medida é nula. A partir do ponto B, o cloro combina-se com os compostos azotados, permitindo a medição de cloro residual. Esta concentração não corresponde à do cloro ativo, mas sim à das cloraminas que também reagem com os produtos utilizados nos equipamentos de medição. Com a adição de mais cloro, chega-se à fase B'C, onde se verifica uma diminuição da quantidade de cloro residual, uma vez que o cloro adicionado serviu para eliminar os compostos formados em B. Finalmente, a partir do ponto C, o cloro adicionado está livre para desempenhar o seu papel de desinfetante [12].

d) Cloraminas

As cloraminas (mono, di e tricloroamina) são produzidas pela reação do ácido hipocloroso com o amoníaco de acordo com o mecanismo reacional descrito pela sequência das equações químicas 5 a 7 [21]:



Das três cloraminas formadas, apenas a monoclорamina é usada como agente desinfetante, sendo um desinfetante menos eficaz que o cloro. Assim, são utilizadas como desinfetante secundário para a manutenção de um sistema de abastecimento residualmente estável, uma vez que a sua elevada estabilidade proporciona à água uma boa proteção contra os posteriores crescimentos bacterianos no sistema de abastecimento de água. Devido à sua fraca reatividade, este desinfetante origina

aproximadamente metade do teor de subprodutos de desinfecção organoclorados comparativamente aos produzidos pelo cloro [3].

e) Dióxido de cloro

O dióxido de cloro (ClO_2) tem vindo a ser utilizado, nos últimos anos, como desinfetante devido às preocupações crescentes com a produção dos subprodutos provenientes da desinfecção com cloro livre. Normalmente, o dióxido de cloro é gerado imediatamente antes da sua aplicação. Devido à sua fotossensibilidade em solução, o dióxido de cloro decompõe-se em aniões clorato (ClO_3^-) e cloreto (Cl^-).

O dióxido de cloro tem como vantagem não oxidar o ião brometo a bromato ou a ácido hipobromoso, uma vez que estes reagem com a matéria orgânica, formando subprodutos de desinfecção bromados [4].

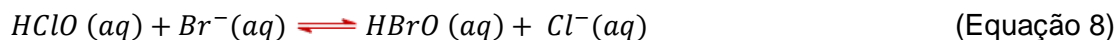
2.12. Subprodutos da desinfecção

Apesar da desinfecção ser um passo essencial do processo de tratamento da água, tem um grande inconveniente que é a formação de subprodutos, DBP's (Disinfection by-Products), provenientes de reações entre o desinfetante e outros compostos que se encontram na água.

Os subprodutos da desinfecção, mais propriamente o clorofórmio e outros trihalometanos, foram primeiramente identificados em 1974, tendo-se posteriormente comprovado a relação de causalidade entre a cloração da água e o aparecimento dos DBP. A maioria das substâncias pertencentes ao grupo DBP é tóxica, carcinogénica e apresenta efeitos nefastos na reprodução humana (incluindo aborto espontâneo) [25].

Devido a esses efeitos, os DBP tornaram-se numa nova fonte de preocupação para a saúde pública e têm surgido diversos estudos para identificação de outros produtos formados durante a cloração da água, bem como os seus efeitos. A exposição do homem aos DBP não acontece somente pela ingestão direta da água, mas também através da sua inalação após a transferência dos DBP para o ar, como também por absorção cutânea durante o banho ou pelo contacto com a roupa interior que acumula DBP em consequência das suas lavagens. Alguns estudos têm sugerido que estas últimas formas de exposição aos DBP's podem ter um efeito igual ou mesmo superior ao da ingestão direta da água [26].

De todos os subprodutos que se formam, os que requerem maior atenção são as substâncias halogenadas, em particular os ácidos haloacéticos. Estes ácidos são formados devido à adição de cloro e hipoclorito na etapa de desinfecção. Se o brometo estiver presente, também irão formar-se ácidos bromoacéticos [3].



São várias as espécies de DBP formadas durante a cloração da água e de entre elas, as de maior proporção ainda conhecidas são os trihalometanos THM (“Trihalomethanes”) e os ácidos haloacéticos HAA (“Haloacetic Acids”), e já em menores proporções podem encontrar-se os haloacetoneitrilos HAN (“Haloacetoneitriles”), as haloacetonas HK, as halocloropicrinas CP, etc [24]. A Figura 5 representa a percentagem dos DBP formados da cloração da água durante o tratamento de água para consumo humano.

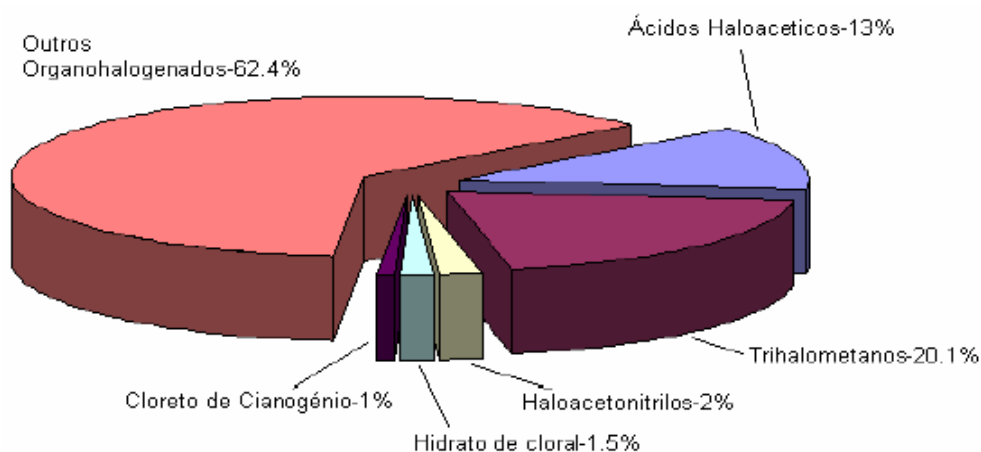


Fig. 5 - Proporção dos DBP resultantes da cloração da água para consumo humano (adaptado de [24] e [31]).

A quantidade de DBP desconhecida ainda é enorme, mas com o rápido desenvolvimento da química analítica, aplicando técnicas de deteção e quantificação de matéria orgânica cada vez mais sensíveis, a lista dos DBP tende a aumentar com novas pesquisas.

2.12.1. Formação de subprodutos

A formação dos DBP durante a fase da cloração da água é complexa e envolve diversas variáveis. Todos os anos são feitos múltiplos estudos na tentativa de criar modelos que permitam perceber melhor a formação dos DBP na água. Dos diversos fatores que influenciam a formação dos DBP destacam-se [27]:

- matéria orgânica dissolvida;
- pH da água a ser desinfetada;
- a dose do cloro aplicada na desinfecção;
- a concentração do ião brometo na água;
- o tempo de residência ou reação do cloro;
- a temperatura a que se encontra a água;

a) Matéria orgânica

Um dos principais precursores dos subprodutos da desinfecção é a matéria orgânica dissolvida na água. Uma vez que a sua presença proporciona um maior crescimento bacteriano, acaba por impedir a ação dos desinfetantes protegendo os microrganismos. Deste modo a quantidade de desinfetante a adicionar no tratamento tem de ser superior, para ser eficaz [23].

A matéria orgânica pela influência que tem na formação dos DBP é designada de precursor orgânico dos DBP [23].



b) pH e temperatura do meio

Existem estudos que demostram claramente a relação entre o pH e a formação dos ácidos haloacéticos. Existe uma relação inversa entre a formação de HAAs e o aumento do pH. Já a temperatura tem um efeito diretamente proporcional na formação dos subprodutos da desinfecção, isto é, no inverno os níveis de HAAs são inferiores aos níveis registados no verão [28].

c) Tempo de residência

O aumento do tempo de residência do agente oxidante implica um aumento na formação da maioria dos subprodutos da desinfecção. No entanto há que ter em atenção, que contrariamente aos trihalometanos (THMs), os HAAs degradam-se com o tempo [29].

d) Presença de Brometo

Com a presença de anião brometo na água, o cloro facilmente o oxida a ácido hipobromoso, que quando reage com a matéria orgânica dá origem a espécies organobromadas. É de notar que esta reação dá-se 25 vezes mais rápida que a reação com o ácido hipocloroso [30].

3. Ácidos haloacéticos

Como já foi referido anteriormente, os ácidos haloacéticos são compostos pouco voláteis que constituem o principal grupo de subprodutos não-voláteis resultantes da desinfecção da água para consumo humano. No total existem 9 diferentes ácidos haloacéticos que se encontram discriminados na Tabela 1 [30].

Tabela 1 – Fórmula química e abreviatura dos ácidos haloacéticos que se formam durante a desinfecção da água por ação do cloro.

Ácido haloacético	Formula química	Abreviatura
Ácido monocloraacético	ClCH_2COOH	MCA
Ácido dicloroacético	Cl_2CHCOOH	DCA
Ácido tricloroacético	Cl_3CCOOH	TCA
Ácido monobromoacético	BrCH_2COOH	MBA
Ácido dibromoacético	Br_2CHCOOH	DBA
Ácido tribromoacético	Br_3CCOOH	TBA
Ácido bromocloroacético	BrClCHCOOH	BCA
Ácido dibromocloroacético	$\text{Br}_2\text{ClCCOOH}$	DBCA
Ácido diclorobromoacético	$\text{BrCl}_2\text{CCOOH}$	DCBA

Os HAA são as segundas espécies de DBP de maior percentagem de ocorrência, logo depois dos THMs. Representam uma preocupação pública devido aos potenciais efeitos carcinogénicos, mutagénicos e reprodutivos para os homens. Por potenciais efeitos nocivos para o homem, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA classificou os 5HAA (MCA, DCA, TCA, MBA e DCA) como possíveis agentes carcinogénicos para os homens e estabeleceu um limite máximo para a soma das suas concentrações, em água de consumo, de 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [4].

No presente trabalho foram estudados esses cinco ácidos haloacéticos legislados pela *US EPA* e que também foram estudados pelo IAREN no passado [6].

3.1. Mecanismo de formação

O mecanismo de halogenação do ácido acético, apresentado na Figura 6, ocorre pela substituição de um hidrogénio por um halogéneo no carbono α , podendo a reação ser catalisada por um ácido ou por uma base. Nas zonas de captação de águas superficiais, a água encontra-se em condições ligeiramente básicas. Na reação de halogenação ocorre primeiro a formação do enolato em meio alcalino e, de seguida, dá-se o ataque nucleofílico ao halogéneo. Se houver um excesso de halogéneo, ocorre uma substituição total dos hidrogénios α . A deslocalização de carga, que ocorre com a substituição dos grupos halogenados, aumenta a acidez do hidrogénio α levando a sucessivas desprotonações e à enolização. Neste sentido, cada halogenação ocorre de forma mais rápida que a anterior [33].

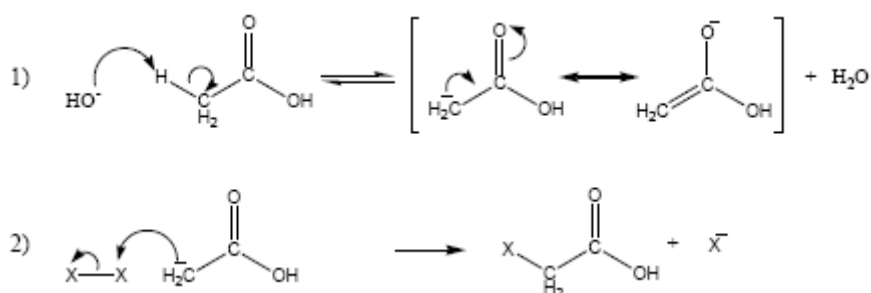


Fig. 6 - Mecanismo de halogenação do ácido acético em meio básico. X=Cl ou Br [33].

3.2. Propriedades

Os ácidos haloacéticos são compostos com a estrutura do ácido acético em que um ou mais hidrogénios do carbono α são substituídos por outros tantos halogéneos, tornando-os ácidos mais fortes do que o ácido acético. A ionização de um ácido carboxílico é um processo de equilíbrio, e qualquer fator que estabilize o anião carboxilato resulta num aumento da força do ácido. Por exemplo, um grupo eletronegativo ligado a um ião carboxilato deslocaliza a carga negativa, levando ao aumento da força do ácido. Desta forma, quanto maior a quantidade dos grupos eletronegativos (halogéneos), presentes na estrutura molecular, maior será a força do ácido (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros e fórmula química dos ácidos haloacéticos estudados (adaptado de [34]).

Composto	Massa molecular		T _{ebulição} (°C)
	(g.mol ⁻¹)	pKa	
Ácido monocloroacético	94,50	2,86	189
Ácido dicloroacético	128,9	1,25	194
Ácido tricloroacético	163,4	0,630	197
Ácido monobromoacético	138,9	2,87	208
Ácido dibromoacético	217,8	1,47	195

Os ácidos haloacéticos são compostos polares e apresentam pontos de ebulição relativamente altos, sendo classificados como compostos semi-voláteis. Atendendo aos seus valores de pKa, estes compostos são considerados ácidos fortes e moderadamente fortes, dependendo do número de hidrogénios substituídos. Dada a sua elevada polaridade, apresentam uma elevada solubilidade em água.

3.3. Toxicologia

Com os estudos que têm vindo a ser realizados sobre as consequências da exposição dos seres humanos a compostos halogenados, o tema sobre os subprodutos da desinfecção de águas tem vindo a ganhar maior importância e crescente preocupação académica. Dos vários estudos já realizados, todos eles alertam sobretudo para o facto deste tipo de compostos serem potenciais carcinogénicos [3].

No caso específico dos ácidos haloacéticos, os estudos realizados evidenciam diferentes problemas para cada um deles. Começando pelo ácido monocloroacético, e tendo em atenção os estudos efetuados em ratos, é considerado como improvável cancerígeno. Já o ácido dicloroacético é um provável cancerígeno, uma vez que ratos expostos a ambientes enriquecidos com aquele ácido contraíram diversos problemas de saúde, tais como tumores hepáticos e toxicidade neuromuscular. No caso do ácido tricloroacético, foram também diagnosticados tumores no fígado de ratos, mas ainda não é certo que o mesmo aconteça nos seres humanos. Para os ácidos monobromoacético, tribromoacético e bromocloroacético não existem dados suficientes que confirmem, ou não, o perigo de ser cancerígeno. À semelhança do ácido dicloroacético, o ácido dibromoacético também é considerado provável cancerígeno

devido ao aparecimento de tumores em animais depois de expostos a ambientes contaminados com dibromoacético [35].

3.4. Legislação

A legislação aplicável às águas superficiais e subterrâneas, bem como às águas para consumo humano, abrange um elevado número de parâmetros organoléticos, físico-químicos e microbiológicos que permitem avaliar a qualidade da água.

O Decreto-Lei 236/98 de 1 de agosto [36], resulta da transposição da Diretiva 80/778/CE, de 15 de julho, e estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com o propósito de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Este diploma é aplicado a águas para os seguintes fins: águas para consumo humano, águas para suporte da vida aquícola, águas balneares e águas de rega. Teve o mérito ainda de estabelecer que a água para consumo humano não deve por em risco a saúde do consumidor, ser agradável ao paladar e à vista dos consumidores, e não causar a deterioração ou destruição das diferentes partes do sistema de abastecimento.

O Decreto-Lei nº 103/2010 de 24 de setembro [37], revogou o Decreto-Lei 236/98 no que diz respeito a alguns parâmetros das águas superficiais, nomeadamente, cádmio, chumbo, hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, mercúrio, níquel, pesticidas totais, bifenilos policlorados, substâncias extraídas com clorofórmio. Este Decreto-Lei procede à transposição para a ordem jurídica interna da Diretiva nº 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, relativamente a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água. Foram estabelecidas as normas de qualidade ambiental com a finalidade de controlar a poluição das águas superficiais, em cuja lista de compostos considerados como contaminantes ambientais já se encontram incluídos alguns dos subprodutos de desinfecção da água de consumo. É o caso do diclorometano, pentaclorobenzeno, triclorobenzenos e clorofórmio.

O Decreto-Lei nº 243/2001 de 5 de setembro [38], pretende regulamentar a qualidade da água destinada ao consumo humano e transpõe para o direito interno a Diretiva nº 98/83/CE, do Conselho, de 3 de novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. Este Decreto-Lei tem por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação da água destinada

ao consumo humano, e assegura a sua salubridade e limpeza. No seu anexo I indica a obrigatoriedade de analisar os THMs na água destinada ao consumo humano. Salienta também que, sempre que possível, deve ser reduzida a concentração de compostos organoclorados em água, sem que, no entanto se comprometa a desinfeção da água. Este Decreto-Lei foi revisto pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto [18], que se encontra ainda em vigor. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição. O Decreto-lei estabelece ainda os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando a mesma seja partilhada por duas ou mais entidades gestoras.

A legislação nacional em vigor relativamente à qualidade da água para consumo humano não refere a monitorização de nenhum dos HAAs. Todavia, a Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR), apresenta o valor de referência de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a soma das concentrações do MCA, DCA e TCA [5].

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA, *United States Environmental Protection Agency*), foi a primeira a estabelecer um valor máximo de contaminação para os HAAs na água de consumo: a soma dos 5HAAs (MCA, DCA, TCA, MBA e DBA), não deve exceder a concentração total de $60 \mu\text{g.L}^{-1}$. Existem nove HAAs bromados e clorados, sendo apenas cinco regulamentados pela US EPA [4].

Já a Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*), apresenta valores específicos para a concentração de alguns HAAs, nomeadamente $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o MCA, $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o DCA e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o TCA [3].

3.5. Metodologias Analíticas

Existem algumas metodologias para a análise dos ácidos haloacéticos, tais como o método da EPA – 557 (2009 - cromatografia iónica com deteção por espetrometria de massa tandem – IC-MS/MS) e o método da EPA – 552 (1990 - cromatografia gasosa com deteção por captura eletrónica – GC-ECD) que se encontra amplamente implementado nos laboratórios de análise química. Este último método

implica que se faça uma derivatização prévia dos ácidos haloacéticos, sendo os produtos da derivatização posteriormente extraídos.

No sentido de abreviar o tempo de análise e diminuir o consumo de reagentes, têm sido desenvolvidos métodos de análise dos HAAs usando a cromatografia líquida de ultra resolução associada à espectroscopia de massa [39-42].

3.4.1. Outros estudos relacionados

Apresentam-se de seguida alguns estudos encontrados na literatura e referentes à análise de ácidos haloacéticos em águas recorrendo à cromatografia líquida:

- a) Num trabalho efetuado previamente no IAREN, os 5HAA foram detetados e quantificados por um método de cromatografia líquida de par-iónico (coluna utilizada: Waters PAH column) com deteção por espectroscopia de massa triplo quadrupolo (LC-MS/MS) e extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) prévia dos analitos. O reagente par-iónico que deu melhores resultados foi a dibutilamina (DBA). A extração em fase sólida mostrou diminuir os limites de deteção (LODs), que variavam entre 0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, dependendo do HAA [6].
- b) Neste estudo foram analisados 9 HAAs por UPLC-MS/MS com recurso a colunas cromatográficas de interação hidrofílica (HILIC, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). Foram testados dois tipos de colunas: uma coluna *BetaMax Acid* e uma *Acquity UPLC BEH HILIC*. Embora o ensaio com a coluna *Acquity UPLC BEH HILIC* mostre limites de deteção mais baixos, permitindo diluir as amostras em 90% de acetonitrilo. O mesmo já não acontecia com o método realizado com a coluna *BetaMax Acid* que permitia que as amostras fossem injetadas diretamente sem ser necessário proceder à sua concentração [39].
- c) Num outro estudo foram identificados 13 HAAs (incluindo ácidos iodoacéticos) também por UPLC-MS/MS. Foram testadas 3 colunas diferentes: uma coluna *Acquity UPLC HSS T3*, uma coluna *HSS C18* e uma coluna *BEH C18*. A separação era auxiliada com a presença de um reagente de par-iónico, sendo também utilizado um padrão interno para corrigir o procedimento de quantificação. A coluna *BEH C18* foi a que apresentou melhor desempenho na separação de uma mistura de 13 HAAs [41].

d) Numa outra aplicação da UPLC-MS/MS, foram estudados 9 HAAs e a separação foi conseguida através de uma coluna ACQUITY UPLC BEH C8. O método de análise foi desenvolvido sem ser necessário recorrer a um reagente de par-iónico ou à concentração das amostras, sendo possível fazer a separação e quantificação dos analitos, obtendo-se limites de deteção entre $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,99 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os diferentes HAAs ensaiados [40].

e) Por fim, em mais um estudo usando a técnica UPLC-MS/MS, foram determinados 9 HAAs recorrendo desta vez a uma coluna Acquity UPLC HSS T3. Neste método foi necessário fazer a acidificação das amostras reais ($\text{pH}=3$) para diminuir os efeitos de matriz, apesar de já não ser necessário proceder à concentração da amostra. Os limites de deteção obtidos variavam entre $0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os diferentes HAAs ensaiados [42].

4. Método Instrumental

4.1. Cromatografia

4.1.1. Nota introdutória

O aparecimento da cromatografia moderna deve-se ao botânico Mikhael Semenovich Tswett em consequência dos vários trabalhos experimentais que efetuou, particularmente na separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas empacotadas com carbonato de cálcio. O uso de sulfureto de carbono como eluente permitiu a Tswett observar a separação dos pigmentos corados presentes nos extratos ensaiados. Neste contexto, o nome de cromatografia tem origem em duas palavras gregas *chroma* (cor) + *graphein* (escrita). A palavra *chroma* poderia ter outra origem: a palavra russa *tsvet* (a mais apropriada transliteração do seu nome russo para o inglês, sendo que “tswett” encontra-se na ortografia alemã) também significa cor. Parece que Tswett utilizou a palavra de origem grega do seu próprio nome para denominar a descoberta da “nova técnica de separação”. Em consideração a esse facto, alguns utilizadores da nova técnica passaram a designá-la, nas décadas seguintes, por “*Tswettography*”, mas essa tendência acabou por cair em desuso [43].

A descoberta da cromatografia foi um passo determinante no desenvolvimento de técnicas hifenadas por acoplamento da técnica de separação cromatográfica com uma ou mais técnicas de deteção convencionais e que viriam impulsionar o aparecimento de inúmeros novos métodos de análise mais seletivos do que os conhecidos até essa altura.

4.1.2. Princípios teóricos

O objetivo de qualquer processo cromatográfico é a separação de analitos de uma mistura. Existem diversas variáveis físico-químicas que influenciam a sua separação, sendo necessário a otimização de alguns dos parâmetros cromatográficos.

Todas as formas de cromatografia envolvem a partição dos compostos em análise entre duas fases diferentes. Os compostos são transportados por intermédio de uma fase móvel através de uma fase estacionária, movendo-se a velocidades diferentes, o que tem como consequência a sua separação física. A velocidade dos analitos ao longo da coluna depende da interação dos analitos com a fase estacionária [46].

Na Figura 7, encontra-se uma representação esquemática do processo cromatográfico.

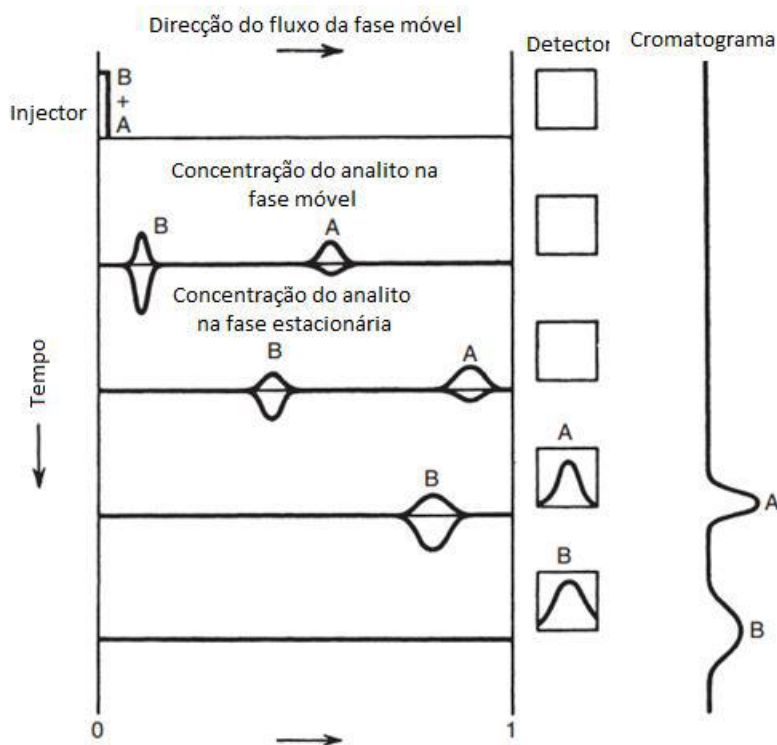


Fig. 7 - Esquema representativo do processo cromatográfico (adaptado de [46])

As linhas horizontais representam a coluna cromatográfica, e cada linha é como um instante do processo num momento diferente. No primeiro instante, a amostra, que é composta por dois componentes A e B, é introduzida na coluna a partir do injetor. Existe uma partição dos componentes entre as duas fases, como se pode observar pelos picos distribuídos acima e abaixo da linha. Os picos apresentados acima da linha representam a quantidade de um componente particular na fase móvel, e os picos abaixo da linha representam a quantidade do componente na fase estacionária. Desta forma, o componente A tem uma maior distribuição na fase móvel, sendo assim, transportado ao longo da coluna a uma velocidade mais elevada que o componente B, que passa mais tempo na fase estacionária. Quando os componentes deixam a coluna passam através do detetor, dando origem a um cromatograma [46].

Existe uma série de conceitos teóricos básicos sobre os métodos cromatográficos, sendo necessária a sua compreensão para uma melhor aplicação da técnica.

a) Coeficiente de Partição

No processo de separação cromatográfica, ocorre a partição do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Este equilíbrio é caracterizado pelo coeficiente de partição (K), que é definido pela razão entre as concentrações de um componente nas fases estacionária e móvel.

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{(Equação 10)}$$

onde C_s corresponde à concentração de um componente na fase estacionária e C_m diz respeito à sua concentração na fase móvel.

Quanto maior for o valor do coeficiente de partição de um componente, maior será valor de C_s , pelo que maior será a interação desse componente com a fase estacionária, ou seja, este componente move-se mais lentamente ao longo da coluna [46].

b) Fator de capacidade

O tempo que as moléculas passam na fase móvel é equivalente ao tempo de retenção de uma substância que não sofre qualquer interação com a fase estacionária, sendo designado por tempo morto, t_m . Para além deste tempo, as moléculas são retardadas no seu caminho pelas interações com a fase estacionária, levando a um tempo adicional t'_r , designado por tempo de retenção ajustado.

Desta forma, o tempo decorrido entre a entrada do composto na coluna cromatográfica e a deteção à saída é designado por tempo de retenção t_r , como podemos verificar na seguinte equação.

$$t_r = t_m + t'_r \quad \text{(Equação 11)}$$

Neste contexto, o fator de capacidade é uma grandeza que mede o grau de retenção de um composto numa coluna cromatográfica, e pode ser calculado a partir da equação 12, desde que a velocidade do fluxo se mantenha constante [46].

$$k = \frac{t'_r}{t_m} \quad \text{(Equação 12)}$$

c) Seletividade

A seletividade α , de um sistema cromatográfico é uma medida do afastamento relativo entre dois picos adjacentes no cromatograma, podendo ser expressa a partir da seguinte equação:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Equação 13})$$

onde k_1 e k_2 são os coeficientes de partição do 1º e do 2º pico, respetivamente. De acordo com esta definição, a seletividade tem sempre um valor superior à unidade [46].

d) Eficiência da coluna

A eficiência da coluna pode ser expressa em termos da altura equivalente de um prato teórico (H ou HEPT), e do número de pratos teóricos (N), sendo expressa através da seguinte expressão:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 14})$$

onde L é o comprimento da coluna cromatográfica. Sendo a cromatografia um fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna pode ser expressa pelo número de pratos teóricos, N . Este parâmetro traduz o valor da dispersão dos tempos de retenção para as moléculas de um dado soluto. Assim, para picos simétricos este parâmetro é dado pela equação 15:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W}\right)^2 \quad (\text{Equação 15})$$

Para os picos assimétricos a eficiência pode ser determinada pela equação 16:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{W_{1/2}}\right)^2 \quad (\text{Equação 16})$$

onde W corresponde ao valor da largura do pico na base e $W_{1/2}$ corresponde à largura do pico a meia altura.

Uma eficiência elevada é atingida com um número elevado de pratos teóricos (N), correspondentes a uma menor largura das bandas e, consequentemente permitindo uma melhor separação entre diversos picos. Por outro lado, a eficiência da coluna está inversamente relacionada com a altura dos pratos teóricos (H) [46].

e) Resolução

O objetivo das aplicações cromatográficas consiste na separação de todos os componentes de uma dada mistura. Outra medida da eficiência de uma coluna é a resolução. A resolução é um termo usado para expressar o grau de separação de dois picos adjacentes, que é dada pela equação 17:

$$R_s = 2 \times \frac{[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B} \quad (\text{Equação 17})$$

A resolução é dada pelo quociente entre a diferença dos tempos de retenção (t_r) e os valores médios das larguras dos picos (W_A e W_B) ao nível da linha de base de dois picos adjacentes A e B.

A resolução pode ser também determinada relacionando o fator de capacidade, a seletividade e o número de pratos teóricos da coluna cromatográfica, através da expressão 18:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k_B}{1+k_B}\right) \quad (\text{Equação 18})$$

Para um dado pico com formato gaussiano e com uma resolução superior ou igual a 1,5 ocorre a separação completa entre picos adjacentes.

A resolução poderá ser otimizada através das condições instrumentais adequadas, tal como o uso de uma coluna mais comprida, o que permite o aumento do número de pratos teóricos [46].

4.1.3. Cromatografia líquida

Desde o início da cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*), em 1950, até aos dias de hoje, foram feitos muitos avanços e todos eles foram impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária [44].

Na cromatografia líquida uma determinada mistura de compostos a analisar, passa através de uma coluna cromatográfica com um determinado enchimento e sob a ação de um eluente (fase móvel). Cada composto será eluído da coluna e registado na forma de um pico num cromatograma, a um determinado tempo de retenção [44].

Um sistema de cromatografia líquida é constituído por um reservatório de fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de recolha/tratamento de dados (Figura 8).

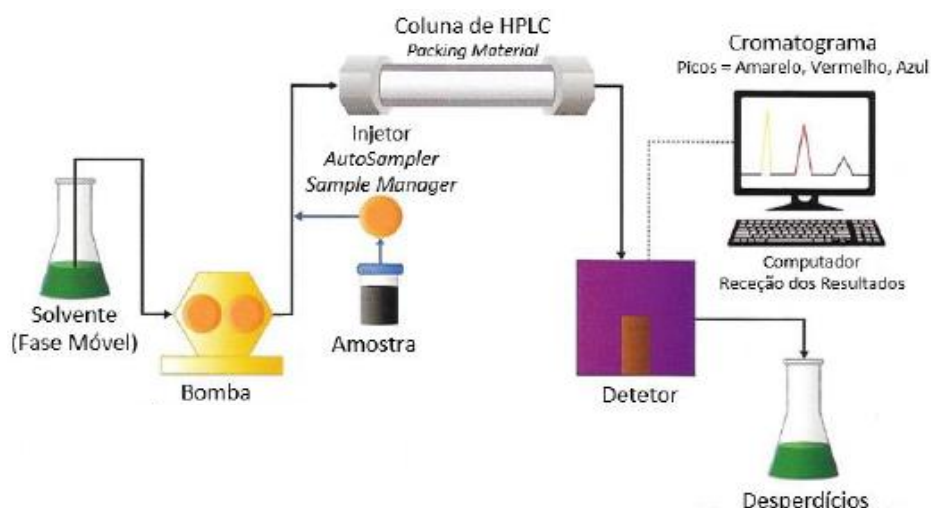


Fig. 8– Esquema de um HPLC (adaptado de [56])

4.1.4. Cromatografia Líquida de Ultra Resolução

A UPLC resulta da combinação de uma coluna cromatográfica contendo partículas com aproximadamente 1,7 μm de tamanho com uma tecnologia que permite o uso de líquidos a pressões elevadas [44].

A evolução ocorrida no desenvolvimento de fases estacionárias tem como base a equação de *Van Deemter* (equação 18), que descreve a relação entre a velocidade linear da fase móvel (v) e a eficiência do método cromatográfico, expressa pela altura do prato teórico (H) (45).

$$H = A + \frac{B}{v} + (C_s + C_m) \times v \quad (\text{Equação 19})$$

O termo A , refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. O alargamento dos picos pode ser minimizado usando colunas de tamanho reduzido.

O termo B , está relacionado com a difusão axial ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de velocidades lineares elevadas da fase móvel.

Os termos C_s e C_m , descrevem a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária [45]. Em que:

$$C_m = \frac{C''_{\omega} \times dp^2}{D_m} \times v \quad (\text{Equação 20})$$

Onde dp corresponde ao tamanho médio das partículas da fase estacionária.

De acordo com a equação 19, as partículas de menor tamanho reduzem a altura do prato e dessa forma são obtidas colunas com um maior número de pratos, ou seja, colunas mais eficientes. A eficiência da coluna é proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional ao tamanho das partículas.

Para partículas com valores inferiores a 2 μm , a eficiência da coluna cromatográfica não diminui com o aumento da velocidade linear da fase móvel, ao contrário do que sucede com colunas cromatográficas contendo partículas de tamanho superior a 2 μm . Neste sentido, este tipo de partículas pode ser usado para separações mais rápidas, permitindo uma maior resolução e diminuição do tempo de corrida, como se pode observar na Figura 9 [44 – 45].

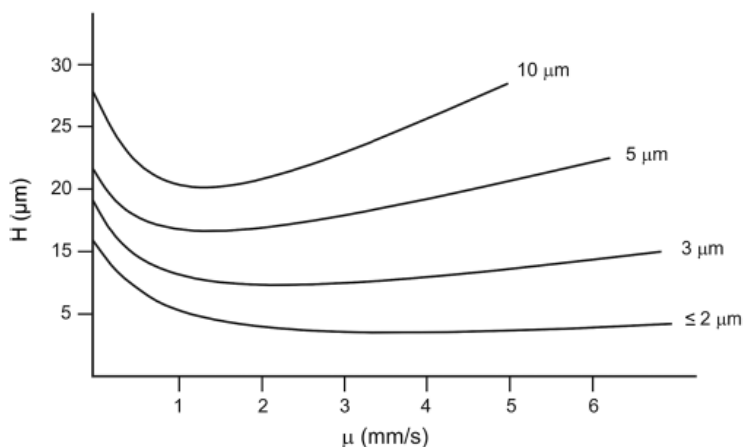


Fig. 9 - Curva de van Deemter para partículas de tamanho 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$ [44].

Um aumento do número de pratos teóricos (N) implica também uma diminuição da largura do pico, mostrando uma maior facilidade de separação dos picos. Dado que a largura do pico é inversamente proporcional à altura do pico, pode-se inferir que a diminuição do tamanho das partículas e consequentemente, o aumento da resolução estão relacionados com um aumento da sensibilidade, teoricamente 2 a 3 vezes maior num sistema de UPLC do que num HPLC. De referir que a deteção por MS é significativamente melhorada pela UPLC, uma vez que a redução da dispersão

cromatográfica a baixas velocidades de fluxo, promovem a eficiência da ionização e consequentemente, aumentam a sensibilidade.

A diminuição do tamanho da partícula provoca um aumento na pressão do sistema, conforme a Equação 21 [44]:

$$P = \phi \times \frac{L \times \eta \times \mu}{100 \times d_p^2} \quad (\text{Equação 21})$$

Onde P é pressão, ϕ é a resistência ao escoamento, L o comprimento da coluna (mm), η a viscosidade da fase móvel (mPa/s), μ a velocidade linear (mm/s) e d_p é o tamanho da partícula (μm) [44].

Tendo por base a interpretação da equação anterior, se o tamanho da partícula for reduzido para metade, a pressão irá aumentar para um fator de 4. Sendo assim, o uso de partículas com diâmetros menores está associada a colunas de menor comprimento, e o aumento da pressão não será 4 vezes maior, mas, mesmo assim, atingirá valores que não são compatíveis com o sistema de HPLC [44 – 45].

Para tirar proveito do aumento da resolução, de uma velocidade e sensibilidade superior proporcionada pelas partículas mais pequenas ($\leq 2 \mu\text{m}$) é necessária uma tecnologia diferente da existente no HPLC. As modificações principais num sistema de UPLC são as seguintes [44,45]:

- Uma bomba capaz de impulsionar a fase móvel de forma suave e reprodutível que possa compensar a compressibilidade do solvente que funcione em ambos os modos de separação isocrático e de gradiente.
- Detetores com elevada taxa de aquisição de forma a conseguir capturar um número suficiente de dados que permita a integração de um pico do analito de forma reprodutível, dado que este pico pode ter uma largura de pico a meia altura menor que 1 segundo.
- A introdução da amostra também é crítica, houve a necessidade de desenvolver injetores precisos com capacidade para injeção de volumes pequenos, de forma a evitar a dispersão da amostra, o que levaria ao alargamento do pico cromatográfico.
- A utilização de colunas com partículas $\leq 2\mu\text{m}$ como material das colunas cromatográficas aumenta a resistência ao fluxo da fase móvel, pelo que estas

colunas necessitam de operar a pressões mais elevadas. Neste sentido, é necessário a utilização de colunas com uma boa resistência mecânica que resistam a valores de pressão elevados, que consigam ser estáveis numa grande gama de pH.

4.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa baseia-se na ionização em fase gasosa das moléculas da substância a analisar, sendo os iões separados pela sua razão massa carga (m/z).

Um equipamento de MS é constituído pela fonte de ionização, um sistema de orientação dos iões (lentes de focagem), um analisador de massas e um detetor [49] como no exemplo demonstrado na Figura 10.

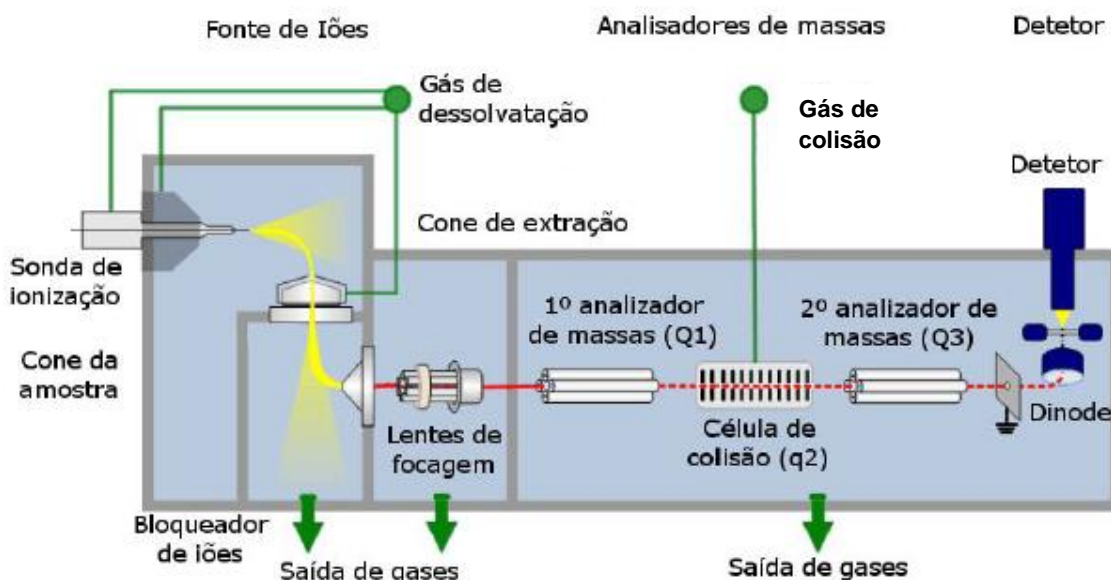


Fig. 10 - Esquema de um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo usado em cromatografia líquida [57].

Por esta técnica se basear no deslocamento de iões ao longo de um espaço de dimensão conhecida, é necessário que não existam outras moléculas no seu caminho que com eles possam interferir. Desta forma é necessário recorrer a um vácuo elevado para trabalhar com um analisador de espectrometria de massa.

O ião correspondente à molécula inicial (ião molecular) sofre geralmente fragmentação, sendo que cada molécula geralmente possui uma sequência de fragmentação característica, o que possibilita a elucidação da estrutura química de moléculas desconhecidas ou a quantificação e identificação de moléculas alvo com base em fragmentos característicos.

4.2.1. Fonte de ionização

Na técnica de *electrospray* os iões são produzidos pela introdução da amostra através da ponta de um capilar como se pode observar na Figura 11, para a câmara de ionização, onde existe uma diferença de potencial elevada entre o capilar e o cone da amostra, criando um cone de Taylor e promovendo a formação de gotas multicarregadas. As gotas multicarregadas começam a perder volume por perda de solvente e passam pelo cone da amostra, para a câmara intermédia onde o primeiro nível de vácuo é produzido, sendo que com o acumular de cargas as gotas alongam e formam um novo cone de Taylor, onde se formam novas gotas de dimensão mais reduzida e com uma carga mais elevada. Estas gotas continuam a perder volume até que a carga das gotas seja demasiado elevada e se dê a desadsorção dos iões que passam depois pelo cone de extração para as lentes de focagem e por fim para o analisador [55].

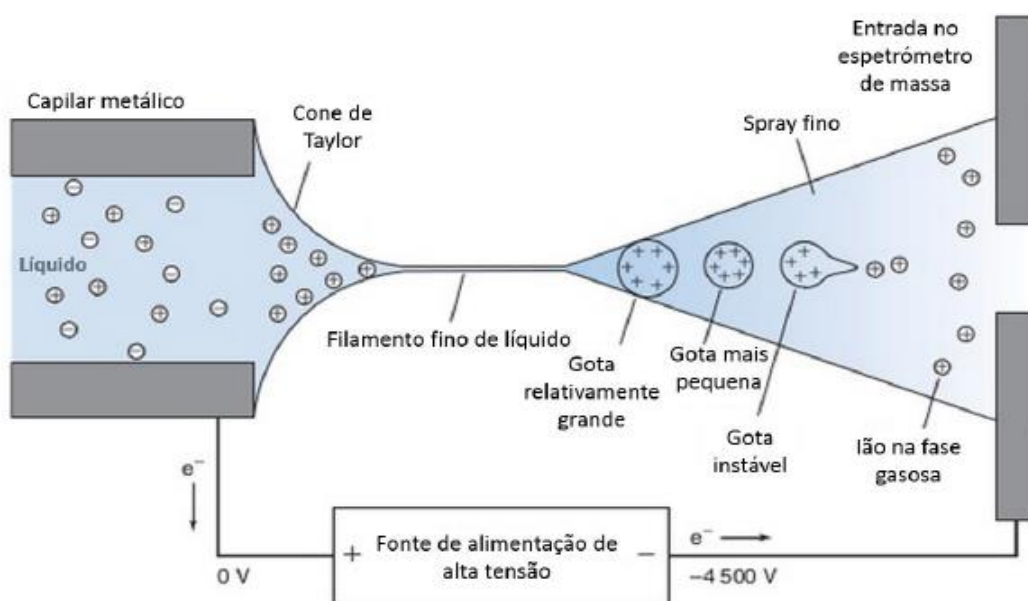


Fig. 11 – Esquema da formação de iões por ESI (adaptado de [55]).

Devido à forma como são produzidos os iões, e ser possível aplicar uma diferença de potencial positiva ou negativa, esta técnica permite a produção de iões positivos no modo de *electrospray* positivo (ESI⁺) e negativos, no modo de *electrospray* negativo (ESI⁻), como também permite obter iões multicarregados, o que faz desta técnica uma ferramenta muito versátil para uma vasta gama de moléculas [52].

4.2.2. Analisador de massas

Após serem produzidos, os iões são acelerados por meio de um campo elétrico, sendo depois separados pela sua razão massa-carga no analisador.

Um exemplo de um analisador de massas é o analisador de quadrupolo, estando apresentado esquematicamente na Figura 12. Este é constituído por 4 barras metálicas cilíndricas e paralelas colocadas duas a duas, equidistantes de um eixo central. O funcionamento é feito pela aplicação de uma corrente contínua (dc) a uma barra e uma amplitude de voltagem de radiofrequências (rf) à outra barra com a mesma polaridade onde os iões ressonantes com a amplitude da radiofrequência aplicada deslocam-se ao longo do analisador e os não-ressonantes colidem com as barras do quadrupolo, não chegando ao detetor. A separação de massas de acordo com a sua razão massa-carga é obtida através da variação rápida da voltagem de radiofrequências, de forma a permitir que as várias massas cheguem ao detetor [52].

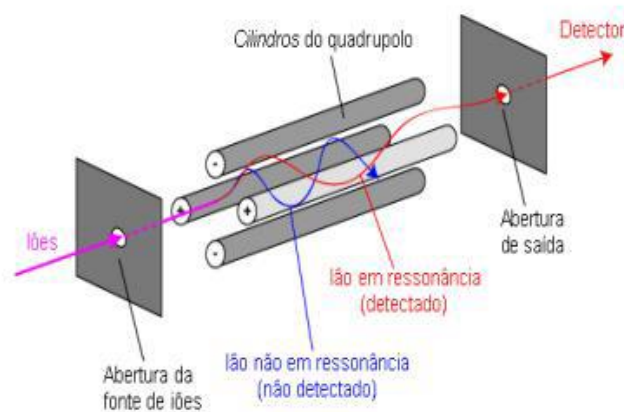


Fig. 12 - Esquema de um quadrupolo [57].

Os modos de operação de um analisador de massas de quadrupolo são o modo de *Full Scan* onde se obtém o espectro de massas de um composto numa gama pré-definida e o modo de *Selected Ion Recording/monitoring* (SIR ou SIM) que apenas

monitoriza massas específicas, sendo assim utilizado apenas para quantificação e não dando informação necessária para a identificação de um composto. Por outro lado, é possível também utilizar mais do que um analisador de massas em série, sendo este designado por espectrometria de massa *tandem*, ou MS/MS [52].

Os modos de funcionamento *tandem* são muito importantes em análise vestigial de compostos alvo, devido a estes poderem utilizar as duas operações do quadrupolo simples em ambos os analisadores de forma independente, permitindo atingir uma maior sensibilidade, seletividade, e reduzindo os limites de deteção e quantificação do equipamento [52]. Um exemplo de espectrómetro de massa com funcionamento *tandem* são os que possuem analisadores triplo quadrupolo.

Triplo quadrupolo

O analisador de triplo quadrupolo é composto por analisadores de quadrupolo colocados em sucessão. Estes equipamentos podem ser utilizados como um simples quadrupolo ou como um triplo quadrupolo. Quando se utiliza apenas o primeiro quadrupolo este analisador permite o uso dos modos normais de funcionamento de quadrupolo simples [52]. O equipamento utilizado neste trabalho apresenta um sistema do tipo triplo quadrupolo (MS/MS), ou seja, a junção de três quadrupolos em série (Figura 13).

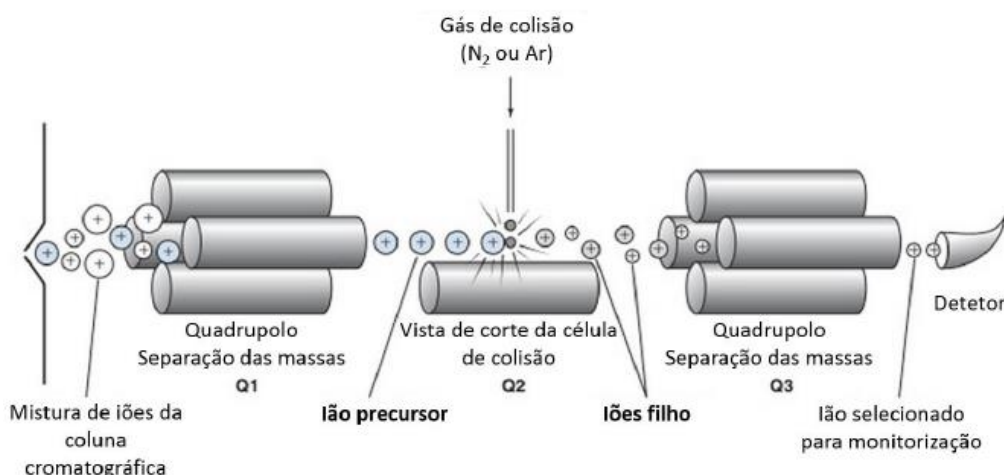


Fig. 13 - Esquema de um triplo-quadrupolo (adaptado de [55]).

Esta técnica instrumental é também designada por espectrometria de massa *tandem*. A espectrometria de massa *tandem*, é qualquer método envolvendo pelo menos duas etapas de análise de massas, em conjunto com um processo de fragmentação ou de uma reação química que causa uma alteração na massa de um ião.

Este analisador de massa funciona do seguinte modo (Figura 12): no primeiro quadrupolo (Q1) ocorre a seleção de um ião precursor. O segundo quadrupolo (Q2) é uma célula de colisão, onde é introduzido um gás inerte de colisão (geralmente Ar, He ou N₂) a uma certa pressão que irá provocar colisões com o ião precursor que entra no quadrupolo. Este ião sofrerá uma fragmentação, processo denominado dissociação induzida por colisão, dando origem a diversos fragmentos denominados de iões produto. No terceiro quadrupolo (Q3) os iões produtos gerados na célula de colisão são separados por variação da voltagem de radiofrequência, tal como sucede no primeiro quadrupolo, seguindo depois para o detetor de massas. O triplo quadrupolo funciona normalmente em modo *Product ion scan* ou em modo MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*) [52].

O modo de operação *Product ion scan* permite a seleção de um ião precursor com uma dada razão m/z e a análise de todos os iões produtos resultantes da colisão desse ião com um gás. Neste modo de operação, o primeiro quadrupolo está a operar em modo SIM (do inglês, *Selected Ion Monitoring*), e o terceiro quadrupolo em modo *full scan*. Com este modo de operação é possível determinar os iões produtos resultantes da fragmentação do ião precursor [51-52].

Na análise de HAAs na água de consumo é importante trabalhar com o máximo de seletividade e sensibilidade possíveis, pelo que o modo de operação a utilizar para validação do método analítico e posterior análise em rotina foi o modo MRM. Neste modo de operação, os dois quadupolos trabalham no modo SIM selecionando e focando iões de razão m/z específicas. Este modo de operação permite a focagem nos iões precursores e produto por maiores períodos de tempo, conseguindo-se desta forma um aumento na sensibilidade e seletividade [51].

Quando se utiliza o modo MRM em quantificação geralmente definem-se as condições para duas transições MRM, sendo geralmente a mais intensa para quantificação (MRM1) e a segunda mais intensa para confirmação do composto (MRM2) [52]. Quantificar dois fragmentos com origem do mesmo ião precursor torna-se impossível em moléculas pequenas. No entanto se a molécula em questão possuir isótopos (como no caso de moléculas halogenadas) é possível identificar dois ou mais iões precursores, permitindo assim obter dois ou mais iões produto.

5. Validação

Sempre que se realiza um método de ensaio analítico este está sujeito a diversas fontes de incerteza aleatória ou sistemática. Esta incerteza pode fazer com que os resultados obtidos difiram largamente do valor real, o que torna o método inadequado para satisfazer os fins para os quais foi usado. Para se evitar, de forma expedita, que estas situações ocorram com demasiada frequência em laboratórios de análise química, o método analítico deverá ser selecionado a partir de métodos descritos por normas internacionais ou nacionais e potencialmente capazes de cumprir com as exigências requeridas. Porém, a confiabilidade do método selecionado só fica concluída quando se demonstra experimentalmente que o método reúne, nas condições de ensaio, as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Essa demonstração experimental tem a designação de validação do método analítico e é assegurada pela execução de um conjunto de procedimentos experimentais, que têm por objetivo a demonstração da adequabilidade do método analítico para satisfazer os requisitos que lhe são impostos [53].

Os requisitos para a validação do método são (i) a descrição detalhada do método de ensaio, (ii) a avaliação do grau de exigência dos ensaios e (iii) definição dos parâmetros de mérito a avaliar.

Os parâmetros de mérito usados frequentemente para validar um método analítico são [53]:

- Seletividade e Especificidade;
- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Limite de Detecção e Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.
- Robustez.

5.1. Seletividade e Especificidade

Durante a execução de um método de análise quantitativa é necessário garantir que o método consegue distinguir o analito de espécies interferentes que poderão eventualmente encontrar-se na matriz da amostra ensaiada. Caso contrário, o resultado final virá necessariamente afetado de erros assinaláveis e que se ficam a dever ao facto do método de ensaio ser sensível não só ao analito, como também aos interferentes presentes na amostra, o que torna o método inapropriado tendo em conta os objetivos pretendidos [53].

Sempre que possível, os métodos a selecionar para um dado fim deverão ser específicos do analito para permitir a sua quantificação na presença de interferentes, com a garantia de que a grandeza medida quantifique apenas o analito. Todavia, os métodos específicos são bastante raros, pelo que a grande maioria dos métodos de análise que se encontram disponíveis na literatura são métodos seletivos, isto é, são métodos sensíveis ao analito e a um conjunto restrito de interferentes. Perante esta realidade é fundamental introduzir alterações ao método de análise com o intuito de eliminar as interferências ou reduzir as suas concentrações para níveis de influência desprezável, tornando o método inicialmente seletivo num método específico nas condições de ensaio. Assim, é muito comum os métodos de análise incluírem procedimentos adicionais que envolvem a separação prévia dos interferentes ou eventualmente a sua dissimulação por efeito de uma ou mais reações químicas planeadas para esse fim [53].

De uma maneira geral, a presença de interferentes numa amostra ensaiada por um método analítico é frequentemente avaliada através da execução de um planeamento experimental do tipo fatorial, sendo os resultados finais analisados com recurso à ANOVA. Um outro procedimento, que tem vindo a ser usado com mais frequência, é o ensaio de recuperação, que permite inferir sobre a seletividade do método por avaliação da sua exatidão.

Para os métodos que recorrem à espectrometria de massa *tandem*, existe outro requisito para validar a especificidade. Este requisito é a razão de confirmação (RC), que é definida como sendo a razão entre as áreas obtidas para as transições MRM1 e MRM2. Esta razão deve ser o mais próxima possível de 1 para o método ser específico, devendo a transição MRM1 ser a de maior intensidade.

$$RC = \frac{A^{MRM1}}{A^{MRM2}}$$

(Equação 21)

Onde:

RC : razão de confirmação para um determinado composto

A^{MRM1} : Área da transição de Quantificação MRM1

A^{MRM2} : Área da transição de Confirmação MRM2

5.1.1. Falsos positivos e falsos negativos

Tão importante como uma boa quantificação é a capacidade do método de confirmar que o analito quantificado é de fato o analito alvo e não outro composto (falso positivo). Também a confirmação de que não se está perante um falso negativo, ou seja de que se verifica a ausência de composto quando este está presente na amostra é de importância crucial. Assim é de extrema importância existir uma forma de identificação do composto com um elevado grau de confiança.

Geralmente quando se recorre a técnicas cromatográficas como GC ou LC, a primeira fonte de informação é o tempo de retenção ao qual o pico cromatográfico é detetado. De uma forma geral, admite-se uma variação máxima de 0,5 % para o tempo de retenção médio de um composto ao longo da curva de calibração, sendo que o tempo de retenção do pico na amostra deve estar a $\pm 0,1$ minutos da média destes em cromatografia líquida e $\pm 0,05$ minutos em cromatografia gasosa.

Para a confirmação de que o pico identificado corresponde de facto ao composto em análise, deve existir uma segunda fonte de informação utilizada para confirmação. Esta segunda fonte de informação quando se utiliza técnicas de espectrometria de massa *tandem* geralmente é uma segunda transição característica para o composto. No entanto pode-se utilizar outras técnicas cromatográficas distintas para a identificação do composto. Quando se utiliza um detetor seletivo, como o ECD, que não fornece mais informação qualitativa do que o tempo de retenção, é necessário recorrer a outra técnica cromatográfica distinta ou a uma coluna cromatográfica com polaridade diferente, de forma a obter informação que permita a identificação do composto [53].

5.2. Quantificação

Sempre que se desenvolve um método quantitativo é necessário uma forma de transformar o sinal de resposta do detetor equipamento numa quantidade química, para o que normalmente se recorre ao traçado de curvas de calibração, e à averiguação dos limiares analíticos e da sensibilidade.

5.2.1. Curva de calibração

A curva de calibração é traçada depois de se submeter a ensaio analítico uma série de soluções padrão do analito de concentração rigorosamente conhecida. Este procedimento é, em geral, realizado antes da análise das amostras, sendo controlado por ensaios frequentes de soluções padrão de analito que servirão de controlo independente para garantir que a curva de calibração permanece válida ao longo do período de ensaio. A curva de calibração pode ser considerada válida por mais tempo se se criar um histórico de análises com padrões de analito de controlo ensaiados em dias sucessivos e desde que cumpra os critérios de aceitação definidos internamente.

Para o traçado de uma curva de calibração é necessário um mínimo de 5 pontos de calibração, sendo o aconselhável 10, devendo estes estarem distribuídos em intervalos iguais ao longo da gama de trabalho.

Para o tratamento matemático dos resultados obtidos recorre-se a regressões lineares utilizando o método dos mínimos quadrados, de acordo com o recomendado pela norma ISO 8466-1. A resposta do detetor é representada no eixo dos yy, assumindo-se que o erro associado à concentração do analito é desprezável quando comparado com o erro do sinal analítico [53].

A avaliação da linearidade da curva de calibração pode ser feita através do cálculo do coeficiente de correlação, do afastamento dos pontos experimentais em relação à curva ajustada (teste da análise de resíduos) e do ganho de precisão quando se passa do ajuste linear de primeira ordem para o de segunda (norma ISO 8466-2 e teste de Mandel).

O coeficiente de correlação linear deverá ser o mais próximo de 1 para dar garantia de que o ajuste linear é adequado para correlacionar as duas grandezas. O seu valor mínimo usado como critério de aceitação da linearidade da curva de calibração é de 0,995.

O teste de análise de resíduos usa como critério de aceitação da linearidade da curva de calibração a amplitude máxima de resíduo de $\pm 25\%$ para os sinais analíticos ao longo da curva de calibração.

Outras formas complementares de avaliar a linearidade é o teste de Mandel, para o qual se aceita uma curva de calibração como sendo linear. Este teste permite avaliar qual o tipo de ajuste da curva de calibração (linear ou polinomial de 2º grau) se adequa melhor ao conjunto dos pontos experimentais. Atendendo aos desvios padrão residuais ($s_{y/x}$) dos dois ajustes é possível calcular o termo da diferença de variâncias (DS^2) que, conjuntamente com a variância residual do ajuste linear de grau 2, ($s^2_{y/x(2)}$) permitirá conhecer o valor teste (VT ou PG) de avaliação da natureza do ajuste da curva de calibração (linear ou polinomial de 2º grau).

Quando o Valor Teste (PG) é menor que o valor tabelado da distribuição de F de Fisher/Snedecor para o número de graus de liberdade envolvidos e para um grau de confiança de 95 %, então a função polinomial de 2º grau não introduz melhoria significativa no ajuste dos pontos experimentais, devendo o ajuste ser feito por uma função linear do 1º grau. [53]

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para isso, traça-se um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração x , e para cada sinal instrumental y , é determinada a razão y/x . Calcula-se a resposta média de todas as razões y/x para todos os pontos de calibração. Ao valor médio foi atribuído um valor de 100% e calculou-se a percentagem de cada valor y/x em função do valor médio. Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deveria dar um valor de 100%.

a) Gama de trabalho

É a gama de concentrações do analito que se pretende validar para o método de quantificação e está delimitada pelo padrão de concentração inferior e superior da curva de calibração.

b) Gama de linearidade

É a gama de concentrações do analito para a qual se consegue cumprir os requisitos de linearidade mínimos, sendo estes validados pelo coeficiente de correlação linear, teste de análise de resíduos, teste de Mandel, entre outros procedimentos.

5.2.2. Limiares analíticos

Os limiares analíticos são de elevada importância em análise vestigial, pois dão informação sobre a concentração mínima de um analito que é possível identificar (LD) e quantificar (LQ) com um elevado grau de confiança.

Para se conhecer os limiares analíticos pode-se recorrer à razão sinal/ruído, à análise de brancos ou de uma solução padrão de analito correspondente ao limite inferior da gama de trabalho em condições de repetibilidade ou de precisão intermédia ou, ainda, ao desvio padrão residual da curva de calibração.

a) Limite de deteção

O limite de deteção (LD) é a menor concentração de analito que se consegue distinguir do branco com um elevado grau de confiança, mesmo que a razão sinal/ruído nessas condições não permita quantificar o analito com o mesmo elevado grau de confiança. O limite de deteção pode ser estimado através dos procedimentos seguintes:

i) Através do desvio padrão residual da curva de calibração linear $s_{y/x}$ [53]:

$$LD = \frac{3,3 \times s_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 22})$$

Sendo m o declive da reta de calibração.

ii) Através da razão Sinal/Ruído (S/N):

$$\frac{S/N}{3,3} = \frac{Conc.}{LD} \quad (\text{Equação 23})$$

em que o LD corresponde à concentração do analito necessária para obter um valor de S/N de 3,3, enquanto S/N representa a razão sinal/ruído para o ensaio de concentração do analito.

b) Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à concentração mínima de analito para a qual se consegue quantificar esse analito com um elevado grau de confiança. O valor de LQ deve ser necessariamente igual ou inferior à concentração do padrão

correspondente ao limite inferior da gama de trabalho, devendo a gama de trabalho ser redefinida caso isto não se verifique. Dada a relação que existe entre os limites de deteção e quantificação ($LQ=3 LD$), a estimativa do limite de quantificação é feita através dos procedimentos usados na estimativa do limite de deteção.

i) Através do desvio padrão residual da curva de calibração linear $s_{y/x}$:

$$LQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 24})$$

ii) Através da razão Sinal/Ruído (S/N):

$$\frac{S/N}{10} = \frac{Conc.}{LQ} \quad (\text{Equação 25})$$

5.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico é vulgarmente definida pela sensibilidade da técnica instrumental, que é determinada pela razão da variação do sinal analítico pela variação de concentração do analito que deu origem à variação do sinal analítico (equação 28). Este parâmetro avalia a capacidade do detetor de distinguir pequenas variações de concentração do analito. É constante dentro da gama de linearidade de uma curva de calibração e, nesse caso, identifica-se com o declive da reta ajustada.

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 26})$$

Onde ΔL é a variação do sinal analítico e ΔC é a variação da concentração do analito que originou a variação do sinal analítico.

Este parâmetro é especialmente importante quando se pretende comparar a resposta de diferentes analitos ensaiados pelo mesmo método de análise ou comparar diferentes métodos de análise usados no ensaio do mesmo analito.

5.4. Precisão

A precisão é o termo geral que se aplica para avaliar a dispersão de resultados obtidos de análises independentes e repetidas para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções padrão sob as mesmas condições experimentais. Para a averiguação da precisão de um método analítico existem duas medidas extremas possíveis: a repetibilidade e a reprodutibilidade, existindo uma medida intermédia, à qual se dá o nome de precisão intermédia [53].

5.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade é um parâmetro que exprime a precisão de um método analítico executado em condições experimentais e operacionais idênticas. Refere-se a ensaios executados sobre uma mesma amostra, em condições de repetibilidade dos ensaios, tais como: realização em curtos intervalos de tempo, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e com o mesmo equipamento

Para determinar a repetibilidade de um método analítico efetuam-se uma série de ensaios consecutivos ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões de referência, em condições de repetibilidade. A sua quantificação é feita através do limite de repetibilidade (r), que para um grau de confiança de 95%, é definido por [53]:

$$r = 2,8\sqrt{s_{ri}^2} \quad \text{(Equação 27)}$$

em que s_{ri}^2 representa a variância da repetibilidade do método analítico.

5.4.2. Reprodutibilidade

A precisão sob condições de reprodutibilidade refere-se aos resultados de medições independentes obtidos utilizando o mesmo método, sobre uma mesma amostra, em laboratórios diferentes, por diferentes operadores e equipamentos.

O limite de reprodutibilidade, R , é definido como sendo o valor abaixo do qual, com um grau de confiança de 95%, se situa a diferença absoluta entre dois resultados de um ensaio efetuado em condições de reprodutibilidade. A sua quantificação é feita a partir de ensaios interlaboratoriais utilizando o mesmo método analítico sobre a mesma

amostra. Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (R) é definido por:

$$R = 2,8\sqrt{s_{Rj}^2} \quad (\text{Equação 28})$$

em que s_{Rj}^2 representa a variância da reprodutibilidade do método de análise em condições de reprodutibilidade.

5.4.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia mede a variabilidade de resultados provenientes de vários ensaios do método analítico executados sobre a mesma amostra e no mesmo laboratório, mas com a variação de determinadas condições, tais como, o analista, o equipamento ou o momento do ensaio

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. De acordo com a norma ISO 5725-3, a precisão intermédia pode ser avaliada de duas formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes, aplicadas em réplicas, duplicados de amostra e padrões de referência ou através do cálculo do desvio padrão associado à precisão intermédia.

5.4.4. Robustez

A robustez de um método descreve a estabilidade desse método quando se provoca deliberadamente pequenas variações nas condições experimentais de natureza ambiental e operacional, nomeadamente a temperatura, humidade exterior, luminosidade, materiais usados, condições de armazenamento, concentração de soluções tampão, estabilidade dos reagentes, entre outros parâmetros. O método diz-se robusto quando é pouco sensível a aquele tipo de variações.

A robustez de um método é, em geral, avaliada pelo teste de Youden, que se baseia na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra, realizados segundo um plano experimental de controlo de fatores suscetíveis de influenciarem o método de análise. Através de uma análise ANOVA dos resultados experimentais, o teste de Youden permite avaliar o efeito produzido por cada um dos fatores nos resultados finais, salientando o tipo de influência - por defeito ou por excesso - exercida por cada um dos fatores estudados [53].

5.5. Exatidão

A exatidão é a medida que visa avaliar a concordância dos valores produzidos por um método quando comparados com um valor de referência aceite convencionalmente como verdadeiro. A avaliação deste parâmetro de mérito pode ser efetuada com recurso a materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, testes comparativos e ensaios de recuperação.

Uma forma geral e simples de exprimir a exatidão de um método analítico é pelo cálculo do erro relativo dos ensaios realizados. Este cálculo pode ser executado de acordo com a equação seguinte:

$$Erro\ relativo = \frac{C_{lab} - C_v}{s} \times 100 \quad (\text{Equação 29})$$

onde C_{lab} é a concentração obtida pelo laboratório e C_v é a concentração aceite como verdadeira. O denominador s identifica-se como um desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de C_v , ou outro desvio indicado pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial.

5.5.1. Ensaios interlaboratoriais

Nos ensaios interlaboratoriais, a entidade organizadora distribui tomas de uma mesma amostra pelos vários laboratórios participantes, que a analisam como se fosse uma amostra real e reportam o resultado que obtiveram.

A entidade organizadora possui o valor de referência para as amostras distribuídas e com base neste valor, e no valor obtido pelos laboratórios calcula o fator de desempenho *Z-score*, sendo este uma escala de concordância entre o resultado obtido pelo laboratório e o resultado assumido como verdadeiro pela entidade organizadora [53].

5.5.2. Ensaios de recuperação

A utilização de ensaios de recuperação é normalmente o método mais utilizado para avaliar a exatidão de um método interno de um laboratório, devido aos padrões de

referência certificados escassearem e raramente existirem ensaios interlaboratoriais que envolvam os analitos nas matrizes a ensaiar pelos laboratórios.

Nos ensaios de recuperação, a amostra é fortificada com uma solução padrão de analito de concentração conhecida, sendo a solução resultante (amostra fortificada) submetida posteriormente a ensaio analítico, conduzido pelo mesmo método que foi usado na determinação da concentração do analito na amostra, a fim de se conhecer experimentalmente a concentração do analito na amostra fortificada.

O resultado do ensaio de recuperação exprime-se pela razão entre a concentração fortificada do analito obtida experimentalmente, que é igual à diferença de concentrações do analito obtidas experimentalmente antes e depois da fortificação da amostra, pela concentração fortificada do analito que na realidade foi adicionada à amostra.

A percentagem de recuperação (%Rec.) é, então, calculada através da expressão [54]:

$$\% \text{ Re } c. = \frac{C_R - C_A}{C_F} \times 100 \quad (\text{Equação 30})$$

Em que C_R corresponde à concentração do analito na amostra fortificada, C_A corresponde à concentração do analito na amostra sem fortificação e C_F é a concentração fortificada do analito e que resultou da adição de um volume conhecido de uma solução padrão de analito à amostra [54].

Devido à recuperação poder variar com a concentração de analito, é recomendado que se proceda a este ensaio para pelo menos uma concentração próxima de ambos os extremos da gama de trabalho, e para um valor intermédio.

Para que o método possa ser validado como exato, isto é, que não introduza erros sistemáticos apreciáveis. Pelas normas internas do IAREN e para a técnica instrumental em questão é necessário que os resultados dos testes de recuperação estejam compreendidos entre 75% a 125%.

6. Procedimento Experimental

6.1. Equipamento

Para a separação dos HAAs foi utilizado um cromatógrafo líquido *ACQUITY UPLC System* contendo um misturador de solventes binário (*Acquity UPLC™*), um amostrador automático (*CombiPal, Waters*), um desgaseificador interno (*Acquity UPLC™*), um módulo com controlador de temperatura da coluna (*Acquity UPLC™*), uma coluna cromatográfica *Acquity UPLC® HSS T3* (2,1 x 150mm, dimensão de partícula: 1,8 μm , *Waters*) e uma pré-coluna com o mesmo material de empacotamento (*Acquity UPLC™*).

Na deteção dos HAAs após a separação cromatográfica foi utilizado um espectrómetro de massa triplo quadrupolo (MS/MS) *Waters Acquity TQD*, contendo uma sonda de ionização por *electrospray* (ESI), um analisador triplo-quadrupolo, um multiplicador de eletrões e uma bomba de vácuo. Foi também utilizado um gerador de azoto para a ionização dos compostos no detetor e o software *MassLynx 4.1* (fornecido pela *Waters*) para controlo de sistema e aquisição de dados.

A pesagem dos compostos foi efetuada numa balança analítica (modelo AT201 da *Mettler*) e a água ultra-pura foi obtida de um sistema de tratamento de água Ultrapura da marca *Millipore*, modelo *Milli-Q*.

6.2. Material

A preparação das soluções padrão foi feita em balões volumétricos de 5,00; 10,00; 20,00; 50,00; 100,0; 200,0; e 250,0 mL, usando micropipetas de 20,00; 200,0 e 1000 μL (*Eppendorf*) na pipetagem de soluções.

As soluções de ácidos haloacéticos comerciais foram armazenadas em *vials* de vidro escuro de 1,5 mL com septo de PTFE/silicone fornecidos pela *Waters*.

Na injeção das soluções no sistema foram também utilizados uma seringa de injeção cromatográfica (*Waters*) e *loops* de injeção de 20, 50 e 100 μL .

As soluções a analisar eram colocadas em vials de vidro de 1,5 mL com septo de PTFE/silicone fornecidos pela *Waters*.

As amostras analisadas eram recolhidas em Frascos de vidro de 500 mL fornecidos pela *Fisherbrand* ou em garrafas de polipropileno de 500 mL com 60 mg de tiosulfato de sódio, fornecidas pela *Frilabo*.

6.3. Reagentes

Os padrões comerciais dos ácidos monocloroacético, monobromoacético e dibromoacético foram fornecidos por *Dr. Ehrenstorfer* em ampolas de 1 mL (1000 ng/μL em éter *terc*-butilmetílico). Os ácidos dicloroacético (99,0 %) e tricloroacético (99,5 %) foram fornecidos no seu estado puro (*Dr. Ehrenstorfer*). O metanol (99,9 %) utilizado na preparação de soluções e na cromatografia foi fornecido pela Carlo Erba, o ácido fórmico (98%) foi fornecido pela Fluka, o ácido acético (99,8 %) foi fornecido pela Honeywell e o ácido ascórbico (≥99,0 %) fornecido pela Sigma-Aldrich. A água ultra-pura usada neste trabalho foi tratada por um dispositivo da marca Milipore, modelo MilliQ.

6.4. Preparação de soluções

6.4.1. Solventes e fases móveis para a cromatografia

Na separação cromatográfica utilizou-se uma mistura de água ultra-pura e ácido fórmico (0,1% v/v) como fase móvel aquosa (Fase móvel A). Como fase móvel orgânica (Fase móvel B) e para solvente de lavagem forte de seringa foi usado o metanol. Como solvente de lavagem fraca de seringa foi utilizado uma mistura de água ultra-pura e metanol (1:1).

6.4.2. Soluções padrão

a) Padrões primários

Os HAAs comercializados em solução de éter *terc*-butilmetílico sob a forma de ampolas de vidro de 1 mL foram transferidos para vials de vidro âmbar e armazenados no frigorífico à temperatura de 5 – 8 °C. Os HAAs comercializados em estado puro foram armazenados no frigorífico nos recipientes originais.

b) Soluções padrão intermédias

Para os ácidos monocloroacético (MCA), monobromoacético (MBA) e dibromoacético (DBA) foram preparadas soluções padrão de concentração intermédia de 10 mg.L^{-1} para ser usada na preparação de soluções mais diluídas. Estas soluções foram preparadas a partir dos correspondentes padrões primários ($1000 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ em éter *terc*-butilmetílico), tendo-se pipetado $100 \mu\text{L}$ para balões volumétricos de $10,00 \text{ mL}$ e adicionado metanol até à marca do balão.

Para os ácidos dicloroacético (DCA) e tricloroacético (TCA) foram preparadas soluções padrão de concentração intermédia de 200 mg.L^{-1} . Na preparação destas soluções foram usadas as substâncias puras obtidas comercialmente, tendo-se adicionado uma massa rigorosamente conhecida (Tabela 3) de cada uma das substâncias para balões volumétricos de $50,00 \text{ mL}$. A solubilização dos dois ácidos, bem como o ajuste do volume final do balão volumétrico foi efetuado com metanol.

Tabela 3 - Massas pesadas e respetiva concentração das soluções intermédias dos ácidos tricloroacético e dicloroacético.

Composto	Massa pesada (mg)	Concentração (mg.L^{-1})
TCA	11,00	218,9
DCA	9,60	190,(1)

c) Soluções padrão individuais para infusão

Com o auxílio de balões volumétricos de $10,00 \text{ mL}$, foram preparadas soluções padrão de 1 mg.L^{-1} em metanol de cada um dos 5 HAAs a partir das soluções padrão intermédias. Na Tabela 4 encontram-se registados os volumes das soluções padrão de concentração intermédia usados na preparação das soluções padrão 1 para infusão.

Tabela 4- Volumes das soluções padrão de concentração intermédia usados na preparação das soluções padrão para infusão dos 5 HAAs.

Composto	Volume pipetado (μL)	Concentração final (mg.L^{-1})
MCA		
MBA	1000	
DBA		1,00
DCA	52,6	
TCA	45,7	

d) Solução padrão conjunta para otimização cromatográfica

Na otimização das condições operacionais cromatográficas usou-se uma solução padrão contendo os 5HAAs numa concentração individual de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esta solução foi preparada em balões volumétricos de 10,00 mL a partir das soluções padrão intermédias de cada haloácido, cujos volumes estão indicados na Tabela 5. O ajuste do volume final do balão volumétrico foi efetuado com metanol.

Tabela 5- Volumes das soluções padrão intermédias usados na preparação da solução padrão conjunta.

Composto	Volume pipetado (μL)	Concentração final ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
MCA		
MBA	100,0	
DBA		100
DCA	5,26	
TCA	4,57	

e) Soluções padrão para estudo da linearidade e validação do método analítico

Para proceder ao estudo da linearidade e validação do método analítico preparou-se inicialmente uma solução padrão conjunta de 10 mg.L^{-1} , em metanol, de

cada um dos HAAs num balão volumétrico de 10,00 mL. As condições experimentais de preparação desta solução estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Volumes pipetados para a preparação da solução padrão conjunta intermédia

Composto	Concentração inicial (mg.L ⁻¹)	Volume pipetado (μL)	Concentração final (mg.L ⁻¹)
TCA	218,9	457	
MCA	1000	100,0	
MBA	1000	100,0	10,00
DBA	1000	100,0	
DCA	190,1	526	

A partir da solução anterior prepararam-se soluções padrão contendo todos os haloácidos em concentrações compreendidas entre 1 – 100 μg L⁻¹ usando água ultra-pura como solvente. Estas soluções foram usadas nos estudos da linearidade e dos limiares analíticos do método analítico. Os detalhes experimentais da preparação destas soluções estão indicados na Tabela 7.

Tabela 7- Detalhes experimentais da preparação das soluções padrão dos haloácidos usadas no traçado da reta de calibração.

Solução Padrão	Volume pipetado (μL) / Volume balão (mL)	Concentração dos 5HAAs (μg.L ⁻¹)
1	2,00 / 20,00	1,00
2	3,00 / 10,00	3,00
3	5,00 / 10,00	5,00
4	10,00 / 10,00	10,00
5	20,00 / 10,00	20,00
6	30,0 / 10,00	30,0
7	40,0 / 10,00	40,0
8	50,0 / 10,00	50,0
9	80,0 / 10,00	80,0
10	100,0 / 10,00	100,0

Numa fase mais avançada do trabalho experimental preparou-se uma solução intermédia de 10 mg.L⁻¹ apenas com 4 HAAs (MBA, DCA, DBA e TCA) visto que o MCA não partilhava a mesma gama de trabalho. Preparou-se uma solução intermédia individual de 10 mg.L⁻¹ deste composto, usando-a para preparar as soluções padrão da reta de calibração.

Para a preparação das retas de calibração definitivas preparavam-se 10 soluções padrão com concentrações entre 5 – 50 µg L⁻¹ para os 4HAAs e entre 20 – 100 µg L⁻¹ para o MCA.

f) Soluções fortificadas

As soluções fortificadas foram preparadas de um modo idêntico às soluções padrão aplicadas no traçado da reta de calibração, mas em vez de água ultra pura usou-se a própria amostra como solvente. O fator de diluição da amostra é considerado desprezável visto o volume de solução padrão pipetado ser muito menor que o volume de amostra utilizado. Foram preparadas 3 soluções com diferentes níveis de fortificação, cujas concentrações fortificadas para os diferentes HAAs estão assinaladas na Tabela 8.

Tabela 8- Níveis de fortificação das soluções usadas nos ensaios de recuperação.

Composto	Concentração (µg.L ⁻¹)		
	Nível de fortificação 1	Nível de fortificação 2	Nível de fortificação 3
MBA	5	25	50
DCA	5	25	50
TCA	5	25	50
DBA	5	25	50
MCA	20	40	100

O nível de fortificação 1 corresponde à concentração do primeiro padrão da gama de trabalho, o segundo nível corresponde a uma concentração intermédia e o terceiro nível corresponde ao último padrão da gama de trabalho.

6.5. Método analítico

O desenvolvimento de um método de LC-MS envolve várias etapas de otimização, nomeadamente as condições operacionais de funcionamento do espectrómetro de massa, da técnica cromatográfica e, sempre que necessário, os procedimentos relacionados com a preparação da amostra.

6.5.1. Otimização das condições do espectrómetro de massas

De forma a se poder utilizar o modo de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) para quantificação, foi necessário escolher duas transições ião precursor - ião produto a monitorizar, bem como otimizar três parâmetros do espectrómetro de massa para definir essas transições, nomeadamente a tensão do capilar, a voltagem de cone e a energia de colisão.

Existem duas formas de executar esta otimização quando se trabalha com equipamentos de LC-MS/MS: por infusão ou por injeção de padrões. O modo mais usual é por infusão, pois é um procedimento mais prático e rápido de executar do que o modo por injeção de padrões.

A otimização dos parâmetros de MRM pela técnica de infusão recorre à introdução da amostra diretamente no espectrómetro de massa com um fluxo de 10 µl/min. Nestas condições procedeu-se à otimização dos parâmetros já referidos: tensão do capilar, tensão de cone e energia de colisão. Na Tabela 9 encontram-se registados outros parâmetros operacionais de funcionamento do espectrómetro de massa e que foram previamente definidos sem recurso a estudos de otimização.

Tabela 9 - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.

Temperatura de fonte (°C)	140
Gás de dessolvatação e cone	Azoto
Temperatura de dessolvatação (°C)	350
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	850
Fluxo do gás de cone (L/h)	50
Gás de colisão	Árgon
Rádio-frequência (V)	0,2
Extrator (V)	3

Inicialmente optou-se por usar a função *Intellistart*[®] disponibilizada pelo software de suporte ao espectrómetro de massa, que permite de um modo automático identificar não só as transições MRM1 e MRM2 de cada um dos compostos, como também as condições ótimas para a formação desses fragmentos. Esta ferramenta foi testada nos modos de ionização positiva e negativa, três vezes em cada modo para cada um dos compostos. Mas por falta de repetibilidade dos resultados obtidos optou-se por se fazer a otimização de um modo manual.

a) Otimização da voltagem de capilar

O primeiro passo da otimização dos parâmetros de MRM foi verificar em que modo de ionização (ESI+ ou ESI-) o composto ioniza preferencialmente, ou seja, se este tem tendência a criar iões positivos ou negativos. De seguida procedeu-se à otimização da tensão do capilar, através da aquisição de uma série de espectros de massa no modo *full scan*, utilizando uma voltagem de cone próxima de 20 V e variando o valor da voltagem de capilar de 0,5 em 0,5 até 5 kV.

b) Otimização da voltagem de cone

Para a otimização da voltagem de cone fixou-se a voltagem de capilar no valor otimizado e adquiriram-se vários espectros de massa em modo de aquisição de dados de *full scan* e procedeu-se à variação do valor da voltagem de cone em pequenos intervalos entre 5 V e 30 V para se verificar uma acentuada redução da intensidade de sinal.

c) Otimização da energia de colisão

Para a otimização da energia de colisão adquiriram-se vários espectros de massa utilizando as condições anteriormente otimizadas, no modo de aquisição *daughter scan* (*scan* do ião produto), fazendo-se variar o valor da energia de colisão em pequenos intervalos até 20 eV para que se observasse um decréscimo significativo na intensidade dos picos dos iões produto candidatos.

6.5.2. Otimização das condições cromatográficas

A otimização das condições operacionais da técnica cromatográfica consistiu apenas em estabelecer a composição da fase móvel e o volume de injeção de amostra a ensaiar. Por conseguinte, foram feitos estudos com diferentes volumes de injeção (20, 50 e 100 μL) e diferentes composições da fase móvel aquosa (água + ácido fórmico e água + ácido acético). Quanto à composição da fase móvel orgânica, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna optou-se por usar as condições já usadas pelo laboratório. Nestes ensaios utilizou-se a solução padrão conjunta de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, cuja preparação foi descrita em 6.4.2., enquanto os resultados finais foram avaliados quanto ao perfil de resposta cromatográfica em termos de área do pico, forma do pico, resolução dos picos e razão sinal/ruído.

6.5.1. Estudo da linearidade e validação do método analítico

Os estudos iniciais da linearidade e gama de trabalho foram feitos com as soluções padrão descritas em 6.4.2., usando concentrações a variar entre 1 – 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os limiares analíticos foram determinados pela razão Sinal/Ruído e pelo desvio padrão

residual da reta de calibração. Os estudos da repetibilidade e homogeneidade de variâncias foram feitos em condições de repetibilidade ($n=10$).

6.5.3. Ensaio de recuperação e análise de amostras reais

Os ensaios de recuperação foram efetuados de acordo com o procedimento descrito em 6.4.2. Foram analisadas amostras de água de abastecimento público fornecida pelo concelho de Matosinhos na ausência e na presença de tiosulfato de sódio e de ácido ascórbico.

O tiosulfato de sódio e o ácido ascórbico foram adicionados à amostra a ensaiar no momento da amostragem para neutralizar o cloro residual que ainda possa existir nas amostras, uma vez que o cloro pode ser um possível interferente, pelo que é fundamental impedir definitivamente a reação do cloro com a matéria orgânica que ainda possa estar presente na amostra.

A adição do tiosulfato de sódio à amostra de água foi efetuada no momento da colheita da amostra, dado que a água a ensaiar foi recolhida em garrafas de polipropileno de 500 mL, próprias para este tipo de amostragem, contendo 60 mg de tiosulfato de sódio no seu interior. No caso do ácido ascórbico, a sua adição à água foi efetuada de acordo com a norma interna do laboratório: 1,2 mL de uma solução de 5 g.L⁻¹ de ácido ascórbico por cada 1 mg de cloro presente em 1 L de amostra. Isto torna necessário que se faça previamente a determinação do cloro na amostra.

7. Apresentação e Discussão dos resultados

7.1. Otimização das condições operacionais do espectrómetro de massa

Antes de se iniciar a implementação do método de análise dos HAAs em amostras de água de consumo, procedeu-se à otimização experimental de algumas condições operacionais da fonte de ionização e da célula de colisão do detetor MS/MS. Na fonte de ionização, o procedimento de otimização incidiu sobre a voltagem do capilar e a voltagem do cone de amostragem, enquanto na célula de colisão otimizou-se apenas a energia de colisão. Os ensaios de otimização para cada um dos três parâmetros foram realizados através de um procedimento de otimização sequencial, ou seja, a otimização de um parâmetro foi executada nas condições ótimas dos parâmetros previamente ensaiados.

7.1.1. Voltagem aplicada ao capilar

A voltagem aplicada ao capilar, para formar os iões precursores correspondentes a cada HAA, foi testada entre 0,5 e 5 kV em incrementos de 0,5 kV e em modo negativo. Para os ácidos haloacéticos, espera-se que a desprotonação seja o processo maioritariamente responsável pela ionização daquelas espécies no interior do capilar, razão pela qual se usou o modo negativo do potencial aplicado ao capilar para que a ionização ocorra mais facilmente e em abundância.

A partir dos espectros de massa obtidos nas condições acima referidas foi possível identificar o ião pseudo molecular para cada um dos ácidos ensaiados e que vieram a ser seleccionados como iões precursores desses ácidos.

Pela representação gráfica (Figura 14) da intensidade de sinal do ião precursor vs. voltagem do capilar para cada ácido ensaiado foi possível verificar que a voltagem que proporcionou a maior intensidade de resposta para os ácidos MBA, DBA e DCA foi de 3,00 kV. Sendo de 2,50 kV para o MCA e 3,50 kV para o TCA.

Como a intensidade de resposta máxima para cada ácido não ocorreu para a mesma voltagem e não sendo possível variar a voltagem do capilar no decurso de um

ensaio de modo a garantir a deteção de cada ácido nas condições ótimas de voltagem, optou-se por escolher a voltagem de 3,00 kV, sabendo que esta decisão reduziria a intensidade do sinal referente aos ácidos MCA e TCA em cerca de 10% e 45%, respetivamente.

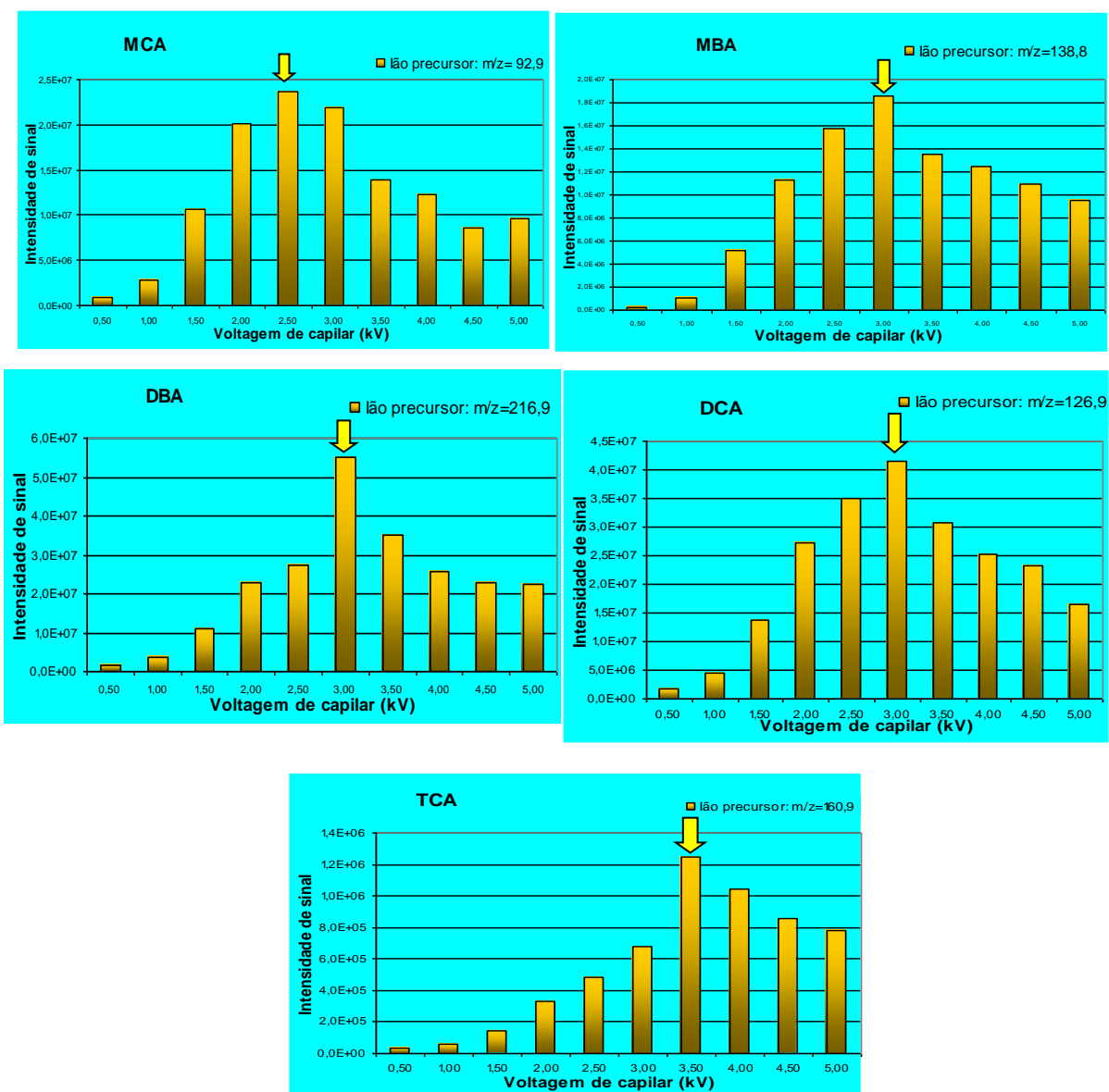


Fig. 14- Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da voltagem de capilar (kV) para o lã precursor de cada HAA.

7.1.2. Voltagem do cone de amostragem

De forma a visualizar qual o valor da voltagem do cone de amostragem que proporcionava a maior intensidade de resposta para os diferentes iões precursores, fez-se variar a voltagem do cone de amostragem em pequenos incrementos entre 5 e 30 V,

aplicando-se ao capilar a voltagem ótima determinada anteriormente. Na Tabela 10 apresentam-se as voltagens do cone de amostragem que conduziram aos valores máximos da intensidade do sinal do ião precursor de cada um dos ácidos ensaiados. No anexo I encontram-se disponíveis para consulta as representações gráficas da intensidade de sinal dos diferentes iões precursores em função da voltagem do cone de amostragem. No caso do MCA e TCA optou-se por usar a voltagem ótima para a transição MRM2 de ambos, visto estas transições terem uma intensidade de sinal relativamente mais baixa que todos os outros HAAs e não afeta em demasia a intensidade de sinal das respetivas transições MRM1. Nestes casos a escolha da voltagem ótima da transição MRM1 poderia resultar na impossibilidade de quantificar o ião produto da transição MRM2 em concentrações mais baixas.

Tabela 10– Resumo dos resultados da otimização da voltagem de cone

Composto	Ião-precursor (m/z)	Voltagem de cone ótima (V)
MCA	92,9	17
MBA	138,8	17
DCA	126,9	15
DBA	216,9	17
TCA	160,9	12

7.1.3. Energia de colisão

Após a otimização das condições de ionização, foi necessário recorrer à otimização dos parâmetros de operação do analisador de massa.

O modo de operação do triplo quadrupolo a ser utilizado é o modo MRM, para alcançar a seletividade e a sensibilidade necessária para a análise dos HAAs existentes nas amostras.

No modo de operação MRM é feito normalmente a escolha de duas transições (ião precursor e ião produto), utilizando-se a transição MRM1 para a análise quantitativa e a transição MRM2 para a qualificação, permitindo assim a confirmação do analito em estudo.

Deste modo, torna-se necessário escolher dois iões-produto para cada analito. O ião-produto com maior intensidade de sinal é escolhido para a quantificação sendo o outro ião escolhido para a qualificação.

Todavia, os HAAs (com exceção do TCA e DBA) são moléculas demasiado pequenas para ser possível a formação de dois iões-produto quantificáveis a partir do mesmo ião-precursor.

A escolha da segunda transição MRM foi possível porque os HAAs são compostos halogenados e tanto o cloro como o bromo têm isótopos (^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{79}Br e ^{81}Br). A segunda transição foi escolhida a partir do isótopo mais abundante do respetivo ião-precursor como se pode ver no exemplo da Figura 15.

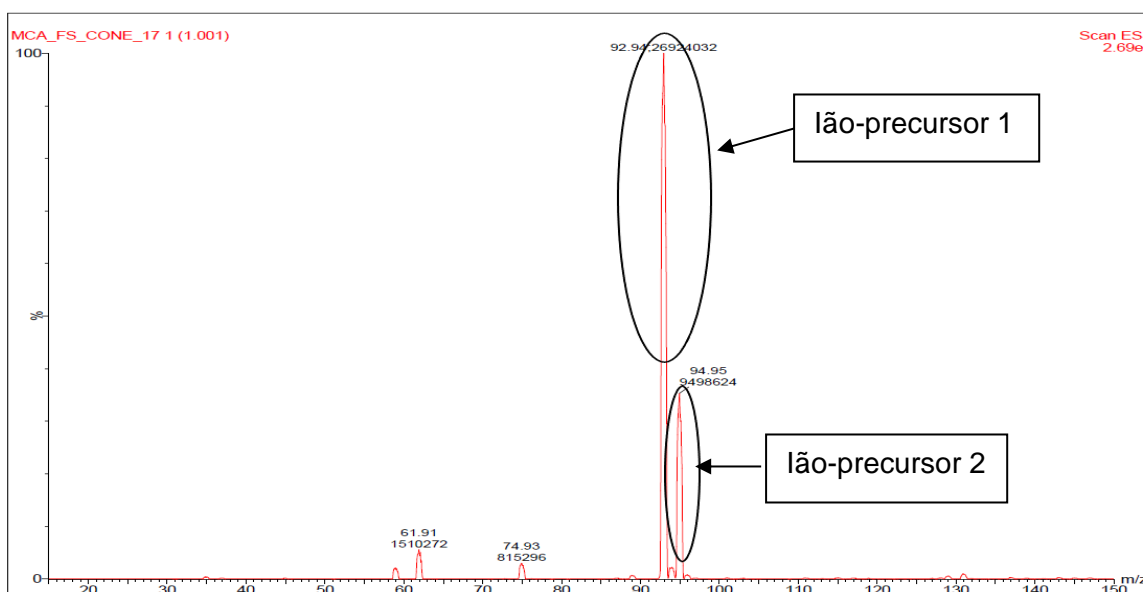


Fig. 15– Espectro de massa do ácido monocloroacético em modo Full Scan.

Para identificar os iões-produto e a respetiva energia de colisão ótima para a sua formação, trabalhou-se com o triplo-quadropolo em modo *Product Ion Scan / Daughter Scan*, fazendo-se variar a energia de colisão em pequenos intervalos até identificar o valor ótimo.

Em geral, o aumento da energia de colisão promove um aumento da fragmentação do ião precursor dando origem aos iões produto. A energia de colisão ótima é aquela que permite a formação de dois iões produtos com o maior valor de intensidade de sinal, mas em que ainda seja detetado o ião precursor, de forma a garantir que os fragmentos originados provêm do respetivo ião precursor (Figura 16).

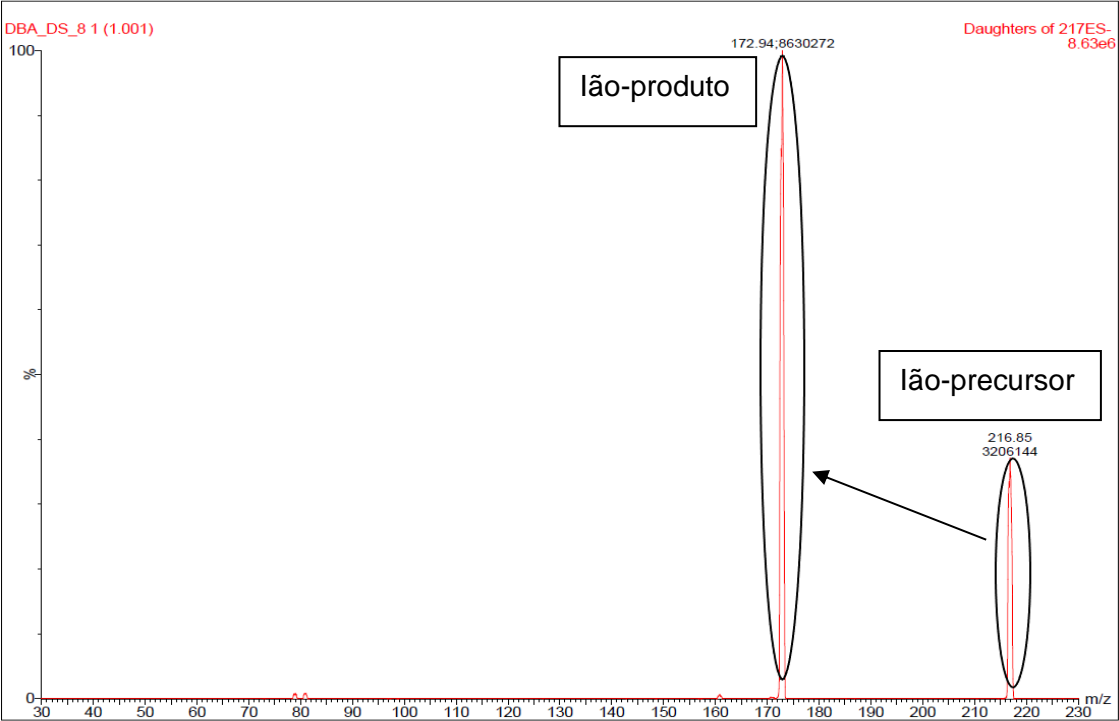


Fig. 16– Espectro de massa do ácido dibromoacético em modo Product Ion Scan para a transição 216,9→172,9.

As duas transições selecionadas para cada composto, bem como as energias de colisão aplicadas, estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11– Resumo das condições ótimas do espectrómetro de massas para cada HAA em estudo.

HAA	Voltagem de Cone (V)	Transição MRM		Energia de Colisão (eV)
		lão precursor → lão produto		
MCA	17	MRM 1	92,9→34,9	6
		MRM 2	94,9→36,9	8
MBA	17	MRM 1	138,8→80,9	8
		MRM 2	136,9→78,9	10
DCA	15	MRM 1	126,9→82,9	10
		MRM 2	128,9→84,9	10
DBA	17	MRM 1	216,9→172,9	8
		MRM 2	214,9→170,9	8
TCA	12	MRM 1	160,9→116,9	6
		MRM 2	162,9→118,9	8

Na tabela 12 apresenta-se um resumo das condições operacionais ótimas usadas pelo IAREN na determinação dos ácidos HAAs. Neste caso a separação cromatográfica foi efetuada num HPLC (*Waters Alliance 2795 HPLC Separation Module*) acoplado a um espectrómetro de massa triplo quadrupolo [6]. Neste estudo era efetuada a concentração prévia das amostras a analisar por extração em fase sólida. A ionização dos HAAs foi efetuada em modo negativo com uma voltagem de capilar de 4 kV [6].

Tabela 12- Condições ótimas de funcionamento do espectrómetro de massa usadas pelo IAREN na determinação dos ácidos HAAs [6].

HAA	Voltagem de Cone (V)	Transição MRM		Energia de Colisão (eV)
		lão precursor → lão produto		
MCA	20	MRM 1	93→35	5
		MRM 2	95→37	3
MBA	20	MRM 1	137→79	3
		MRM 2	139→81	3
DCA	20	MRM 1	127→83	3
		MRM 2	129→85	3
DBA	20	MRM 1	215→171	3
		MRM 2	217→173	3
TCA	20	MRM 1	117→35	5
		MRM 2	119→37	5

Comparando-se os resultados obtidos com os da literatura observam-se algumas diferenças nas condições instrumentais, nomeadamente na voltagem de cone, que é a mesma para todos os haloácidos, e nas energias de colisão, que são muito próximas. Todavia, a diferença mais significativa encontra-se na seleção das transições MRM do TCA, com fragmentos de massas diferentes.

Com as condições do espectrómetro e transições MRM definidas foi possível iniciar a otimização das condições cromatográficas.

7.2. Condições operacionais da separação cromatográfica

As condições operacionais em que decorre a cromatografia condicionam naturalmente o desempenho da separação cromatográfica. Por esta razão, procedeu-se a um estudo prévio de otimização das seguintes condições cromatográficas:

7.2.1. Composição da fase móvel

A fase móvel recomendada para proceder à separação dos HAAs numa coluna C₁₈ é constituída por uma mistura de metanol com uma solução aquosa de um ácido não muito forte [39-42]. Por esta razão, a otimização da composição da fase móvel consistiu em selecionar o ácido com o melhor desempenho de entre os ácidos fórmico e acético. Estabeleceu-se ainda que a concentração do ácido na solução aquosa deveria conduzir a um pH ligeiramente superior a 2 para evitar a degradação precoce da coluna de separação, dado que não suporta meios com pH inferior a 2.

Foram testadas algumas composições diferentes da fase móvel, usando soluções aquosas de ácido fórmico e ácido acético. Optou-se por se usar também metanol visto já ser a usada na rotina e por mostrar ser eficaz na separação.

A solução aquosa de ácido fórmico 0,1 %, preparada em água ultra-pura, mostrou ser a solução ácida com melhor desempenho na separação dos HAAs por assegurar um nível de ruído baixo e conduzir a uma boa resolução dos picos. Um aumento do teor de ácido fórmico aumentaria o tempo de retenção dos HAAs, melhorando assim a separação. Todavia, a solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % já tem um pH compreendido entre 2,6 – 2,8, pelo que não é aconselhável aumentar a concentração do ácido fórmico, sob pena do pH da solução aproximar-se perigosamente do valor limite de utilização.

A substituição do ácido fórmico pelo ácido acético conduziu a uma perda significativa da intensidade de sinal para todos os HAAs, e a um grande aumento do

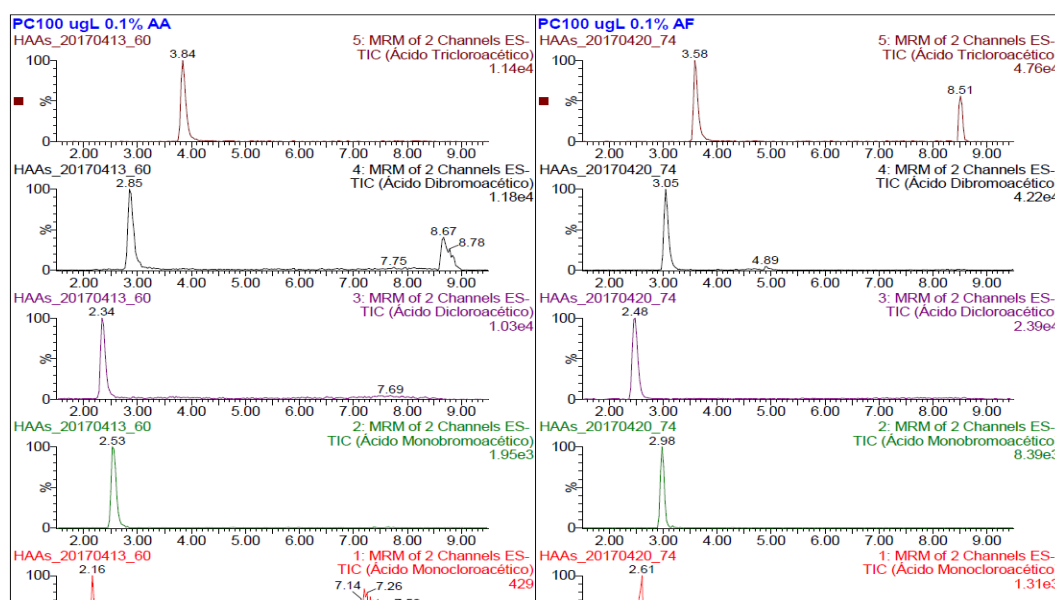


Fig. 17– Cromatogramas registados para diferentes composições de fase móvel aquosa. Solução de ácido acético 0,1 % (à esquerda) e solução de ácido fórmico 0,1 % (à direita).

ruído no caso do MCA (Figura 17). Um aumento do teor de ácido acético para 0,2 % apenas aumentava o tempo de retenção sem qualquer outro benefício. Curiosamente em outros estudos semelhantes o uso de ácido acético na fase móvel mostrou ser mais eficaz que o ácido fórmico quando utilizadas outras colunas C₁₈ (ex: colunas *BEH*). Desconhece-se as possíveis causas deste efeito.

Nos testes efetuados, verificou-se também o aparecimento de um contaminante nos cromatogramas, que aparece com massas moleculares diferentes dependendo do ácido usado na preparação da fase móvel e sempre com tempos de retenção entre 8,50 e 8,70 minutos. O contaminante também foi confirmado na análise de brancos (água ultra-pura).

Mas visto ter um tempo de retenção distante dos HAAs a sua presença não afeta a quantificação dos HAAs. Todavia foram tomadas medidas para garantir que a análise não é afetada, como aumentando o tempo de separação cromatográfica e definindo períodos de monitorização para os respetivos fragmentos de cada HAA.

O tempo de separação cromatográfica foi estabelecido em 11 minutos, para garantir que o contaminante fosse eluído na totalidade antes da análise seguinte.

7.2.2. Períodos de monitorização dos fragmentos referentes aos diferentes HAAs

Também foram estabelecidos períodos de monitorização distintos para cada um dos HAAs, em que o detetor apenas quantifica os fragmentos em questão dentro de uma janela de tempo da separação cromatográfica (Tabela 13).

Tabela 13 - Períodos de monitorização do detetor definidas para cada composto

Haloácido	Período de monitorização (min.)
DCA	[0 – 3,50]
MCA	[0 – 3,50]
MBA	[2,45 – 3,55]
DBA	[2,50 – 4,50]
TCA	[3,00 – 5,00]

Na Figura 18 encontram-se representados os cromatogramas dos 5 HAAs obtidos nas condições anteriormente estabelecidas. Como se pode verificar, a presença do contaminante já não é observada nas novas condições de ensaio.

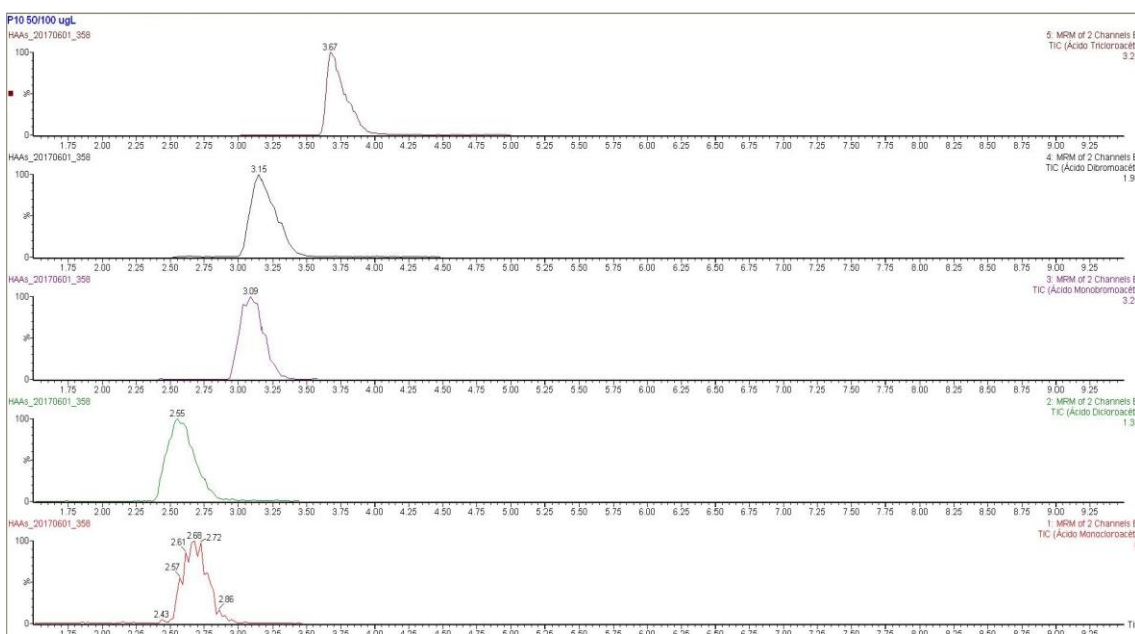


Fig. 18 - Cromatograma dos 5 HAAs com janelas de aquisição definidas.

7.2.3. Outras condições

Foram testados os volumes de injeção de 20, 50 e 100 μL usando os respetivos *loops* de injeção cromatográfica.

Quando usado um volume de 20 μL obtiveram-se valores de área demasiado baixos, tornando difícil a quantificação dos HAAs, principalmente no caso do MCA que por si já fornecia pouca intensidade de sinal relativamente aos outros HAAs.

No caso do uso de um *loop* de 100 μL , as áreas obtidas eram razoavelmente mais elevadas, mas os valores obtidos tinham pouca repetibilidade. Possivelmente devido ao facto de um volume tão elevado saturar a coluna cromatográfica e o detetor, tornando o método menos preciso.

Por tudo isto, foi escolhido um volume de 50 μL para ser usado na implementação do método. Com este *loop* as áreas obtidas eram suficientemente elevadas e com valores suficientemente repetíveis para não haver problemas com a quantificação.

Na Figura 19 apresenta-se o programa de eluição gradiente usado na separação cromatográfica dos HAAs.

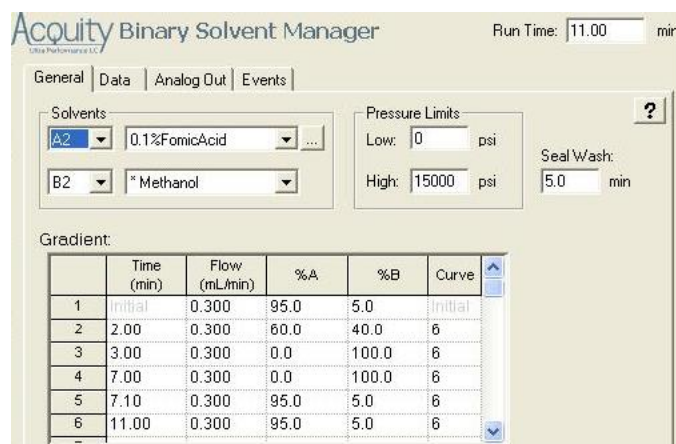


Fig. 19 - Programa da eluição gradiente usado na separação cromatográfica dos HAAs

Os tempos de retenção dos 5 HAAs estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Tempos de retenção característicos dos 5 HAAs para as condições impostas

Ácido haloacético	Tempo de retenção (min.)
DBA	3,2
DCA	2,6
MBA	3,1
MCA	2,7
TCA	3,7

Na Tabela 15 apresenta-se o resumo de algumas condições cromatográficas.

Tabela 15 - Outras condições cromatográficas.

Condições cromatográficas	
Temperatura da coluna (°C)	40
Fluxo do eluente (mL.min ⁻¹)	0,3
Volume de injeção (μL)	50
Tempo de análise (min)	11

O programa da temperatura da coluna foi isotérmico.

7.3. Validação do método analítico

7.3.1. Linearidade e gama de trabalho

A validação do método começou pelo estudo da linearidade e gama de trabalho das retas de calibração dos diferentes HAAs. Os ensaios foram realizados nas condições operacionais previamente estabelecidas e à custa de soluções padrão contendo os 5 HAAs com concentrações entre 1 – 100 μg.L⁻¹, tal como descrito em 6.4.2. e).

O ajuste da reta de calibração para cada um dos HAAs foi obtido a partir do método dos mínimos quadrados, enquanto o grau de linearidade do ajuste foi testado recorrendo a alguns testes estatísticos. A título ilustrativo apresenta-se na Figura 20 a reta de calibração do ácido dibromoacético.

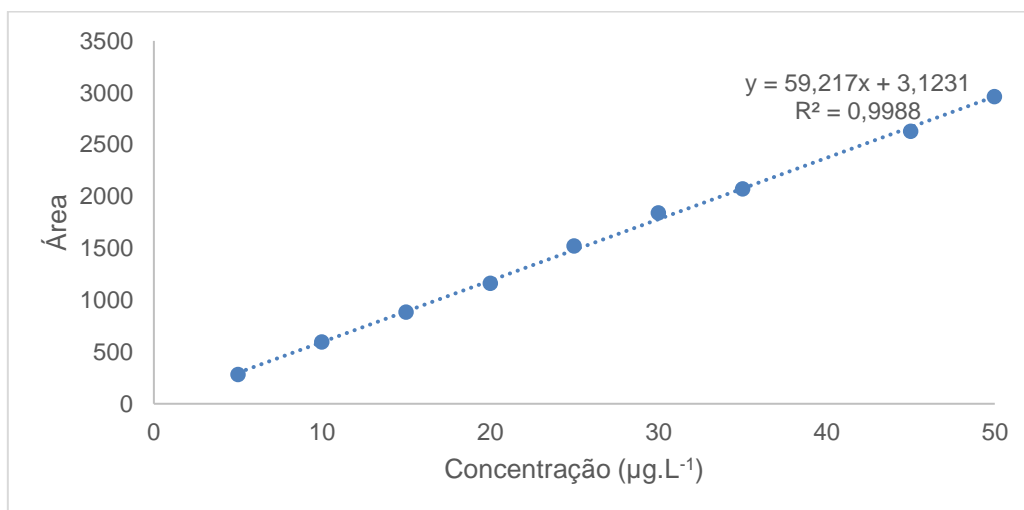


Fig. 20– Reta de calibração do DBA e respetivo coeficiente de correlação

A gama de trabalho de cada HAA foi escolhida tendo em conta o coeficiente de correlação que deverá ser igual ou superior a 0,995 e de modo a que o maior número de HAAs partilhem a mesma gama de trabalho com o objetivo de facilitar a preparação das retas de calibração.

Na Tabela 16 estão discriminadas as gamas de trabalho escolhidas para os 5 HAAs, juntamente com as respetivas equações da reta e coeficientes de correlação.

Tabela 16– Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação para cada HAA.

Composto	Gama de trabalho (µg.L ⁻¹)	Equação da reta	Numero de pontos da reta	Coeficiente de correlação (R ²)
DBA	5 - 50	y = 59,2x + 3,12	9	0,9988
TCA	5 - 50	y = 55,8x + 15,9	9	0,9991
DCA	5 - 50	y = 39,1x + 37,1	8	0,9980
MBA	5 - 50	y = 8,17x + 3,84	8	0,9974
MCA	20 - 100	y = 1,31x - 5,90	8	0,9972

As retas de calibração foram preparadas usando 10 pontos, sendo retirados quando necessário um ou dois pontos da reta até se obter um coeficiente de correlação acima de 0,995. Em todas as retas de calibração preparadas foi necessário retirar um

ou dois pontos até se atingir o valor de coeficiente de correlação mínimo aceitável. Se o ponto da reta a retirar for o primeiro ou último, as normas internas do IAREN obrigam à preparação de uma nova reta de calibração.

Como se pode verificar na Tabela 16, a maioria dos HAAs partilham a mesma gama de trabalho e com coeficientes de correlação aceitáveis. O DBA e o TCA ainda mostravam linearidade até um mínimo de 1 ou 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mas de modo a facilitar a preparação de futuras retas de calibração optou-se por definir uma única gama de trabalho a vários HAAs.

Todavia não foi possível fazer o mesmo com o MCA devido à falta de sensibilidade do método para com este composto ao ponto da linearidade só poder ser avaliada a partir da concentração de $\approx 15 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como se pode verificar através da Tabela 14, o declive da reta de calibração deste ácido é muito baixo comparativamente com os outros HAAs.

Todas as retas de calibração dos HAAs mostraram possuir características lineares até 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, correspondendo à concentração máxima testada.

Para além do teste do coeficiente de correlação, o grau de linearidade das retas de calibração foi também avaliado pelo teste de Mandel e pela análise de resíduos.

A partir da reta de calibração não se garante por si só a existência de linearidade na gama de concentração testada, razão pela qual são realizados outros testes estatísticos.

a) Teste de Mandel

A linearidade de uma reta de calibração pode ser avaliada estatisticamente pelo teste de Mandel. Com o conjunto de resultados experimentais obtidos para o traçado da reta de calibração procede-se ao ajuste da reta de calibração linear (grau 1) e da curva de calibração linear de grau 2. Atendendo aos desvios padrão residuais ($S_{y/x}$) dos dois ajustes é possível calcular o termo da diferença de variâncias (DS^2) que, conjuntamente com variância residual do ajuste linear de grau 2, ($S^2_{y/x(2)}$) permitirá conhecer o valor teste (VT ou PG) de avaliação do grau de linearidade da curva de calibração.

$$VT = \frac{DS^2}{S^2_{y/x(2)}} \quad (\text{Equação 31})$$

Este valor teste é comparado com o valor tabelado da distribuição F (unilateral à direita) para um grau de confiança de 95%.

Os critérios de decisão são:

- Se $VT \leq F$, então a curva de calibração é descrita, para um grau de confiança de 95%, por uma função linear de grau 1;
- Se $VT > F$, então a curva de calibração não é descrita, para um grau de confiança de 95%, por uma função linear de grau 1

Na Tabela 17 apresentam-se os resultados do teste de Mandel.

Tabela 17– Resultados do teste de Mandel

Ácido haloacético	Teste de Mandel ($VT < (F_{(1, n-3, 95\%)})$)
DBA	$1,88 < 5,99$
DCA	$4,73 < 6,61$
MBA	$0,21 < 6,61$
MCA	$0,774 < 6,61$
TCA	$0,69 < 5,99$

Uma vez que todos os valores de VT obtidos se encontram abaixo dos respetivos valores de F tabelado, confirma-se que todas as curvas de calibração são adequadamente ajustadas por uma função linear de grau 1.

b) Homogeneidade de variâncias

Para além do teste do coeficiente de correlação, a gama de trabalho de concentrações dos HAAs foi também avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. Este teste consiste na comparação estatística das variâncias referentes aos

limites (inferior e superior) de concentração da gama de trabalho através do teste F. O valor de teste (VT) é calculado a partir da razão entre as variâncias de 10 ensaios dos limites de concentração da gama de trabalho.

a)

$$VT = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

para

$$S_{10}^2 > S_1^2$$

b)

$$VT = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

para

$$S_1^2 > S_{10}^2$$

O teste é concluído com a comparação de VT com o valor tabelado da distribuição de Fisher (unilateral à direita), para 9 graus de liberdade e para um grau de confiança de 95% (Tabela 18).

Tabela 18– Resultado do teste da Homogeneidade de variâncias

Ácido haloacético	Valor teste (VT) (F _{tab. (n=9, 95%)} = 3,18
DBA	14,37
DCA	19,88
MBA	2,79
MCA	6,98
TCA	21,02

Como se verifica através da Tabela 18, apenas no caso do MBA é que as variâncias não apresentam diferenças significativas entre si. Para os restantes HAAs a falta de homogeneidade de variâncias levaria à redução da gama de trabalho até que o valor de VT fosse menor que o respetivo F tabelado.

A falta de homogeneidade da gama de trabalho é bastante comum em métodos analíticos semelhantes aos implementados no presente trabalho [57]. Por esta razão, o teste de homogeneidade de variância é muitas vezes substituído por outros, em particular pelo teste da análise de resíduos, áreas normalizadas e teste de Rikilt. Estes testes estatísticos são modos complementares de avaliação da gama de trabalho e são

por vezes usados para esta técnica instrumental quando não há homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho.

c) Análise de resíduos

O teste da análise de resíduos consiste em calcular o desvio vertical entre o ponto experimental e o valor estimado pela função de calibração. Os resultados obtidos são então representados em função da concentração das soluções padrão usadas no traçado da curva de calibração. A flutuação dos desvios deverá ocorrer de forma aleatória em torno da linha de ordenada zero.

A Figura 21 mostra a representação gráfica deste teste estatístico para os ácido dibromoacético e na tabela 19 estão compilados os desvios mínimos e máximos referentes a todos os HAAs.

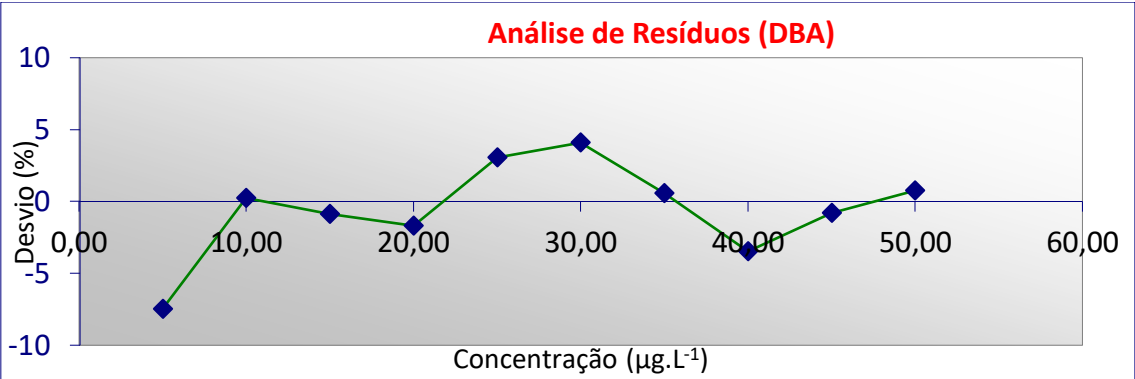


Fig. 21 – Representação gráfica da análise de resíduos do DBA.

Tabela 19– Resultado da análise de resíduos para os 5HAAs.

Ácido haloacético	Análise de resíduos (%)
DBA	(-6,3 – 3,4)
DCA	(-13,4 – 4,0)
MBA	(-8,0 – 8,2)
MCA	(-6,6 – 7,2)
TCA	(-2,5 – 2,3)

O teste estatístico da análise de resíduos permitiu também concluir que existe de facto linearidade, uma vez que os valores obtidos se encontram abaixo do limite de 25%, que é o valor limite imposto internamente pelo IAREN para que uma função de ajuste seja considerada linear.

d) áreas normalizadas e teste de Rikilt

O método das áreas normalizadas e o teste de Rikilt são outros testes de estatísticos que permitem validar a gama de trabalho, que ao contrário da análise de resíduos os resultados oscilam entre a linha de ordenada 100 % (Figura 23).

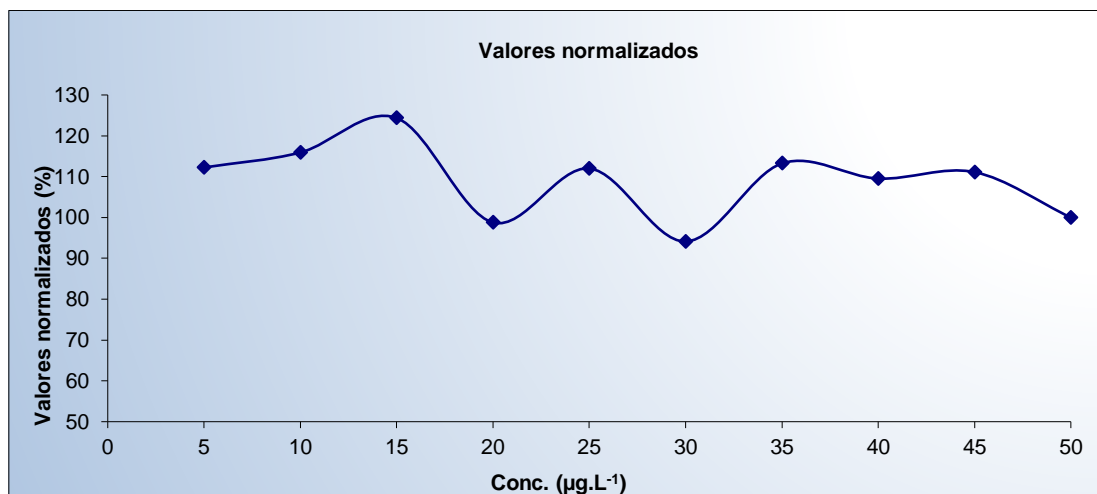


Fig. 22– Representação gráfica do método das áreas normalizadas para o MBA.

Para as áreas normalizadas, o limite imposto pelo IAREN para a aceitação dos desvios é de $\pm 25 \%$. Por sua vez, o teste de Rikilt não é por norma usado no IAREN mas foi imposto um valor limite de $\pm 15 \%$, neste teste são usados normalmente valores da aceitação dos desvios valores entre $\pm 10 - 20 \%$ dependendo do laboratório. Na Tabela 20 apresenta-se o resumo dos resultados destes testes estatísticos.

Tabela 20 – Resultados dos testes das áreas normalizadas e Rikilt para os 5HAAs.

Ácido haloacético	Áreas normalizadas (%)	Teste de Rikilt (%)
DBA	(94,6 – 103,5)	(94,9 – 103,9)
DCA	(100,0 – 108,9)	(95,2 – 103,7)
MBA	(94,1 – 107,8)	(86,9 – 108,9)
MCA	(81,4 – 102,9)	(87,6 – 110,6)
TCA	(99,0 – 104,7)	(96,8 – 102,4)

Atendendo ao conteúdo das Tabelas 17 e 18, a gama de trabalho escolhida para todos os compostos, com base nos resultados dos testes estatísticos aplicados, exibe um grau aceitável de linearidade em todo o seu domínio. Porém, é de salientar que os desvios mais acentuados ocorrem para os ensaios do MCA e MBA, apesar de continuarem dentro dos limites de aceitação impostos. Neste sentido, sempre que seja realizada a análise dos HAAs é recomendado que a calibração instrumental para cada ácido seja realizada com recurso a uma reta de calibração.

7.3.2. Limiares analíticos

Tanto o limite de deteção como o limite de quantificação foram calculados através do desvio padrão residual das retas de calibração ($S_{y/x}$) e da razão Sinal/Ruído como descrito em 5.2.2.

No caso do procedimento baseado na razão Sinal/Ruído, foram ensaiadas soluções padrão até uma concentração mínima de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para o MCA, a concentração mínima de ensaio foi de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Na Tabela 21 apresentam-se os limiares analíticos para os 5 HAAs usando os dois métodos de cálculo referidos.

Tabela 21 – Avaliação dos limiares analíticos para os 5HAAs usando dois métodos de cálculo

Ácido haloacético	Limite inferior da gama de trabalho (µg.L ⁻¹)	Reta de calibração (S _{y/x})		Razão Sinal/Ruído	
		LD (µg.L ⁻¹)	LQ (µg.L ⁻¹)	LD (µg.L ⁻¹)	LQ (µg.L ⁻¹)
DBA	5,0	4,5	13,5	0,083	0,25
DCA	5,0	3,6	11,0	0,083	0,25
MBA	5,0	3,6	10,9	0,055	0,17
MCA	20,0	10,7	32,3	1,2	3,7
TCA	5,0	4,9	14,8	0,093	0,28

Atendendo à Tabela 19, os limites de quantificação (LQ) calculados a partir do desvio padrão residual da reta de calibração dão valores superiores ao limite inferior da reta de calibração respetiva, o que implicaria uma alteração da gama de trabalho para todos os HAAs.

Todavia, visto que os limiares analíticos calculados a partir da razão Sinal/Ruído dão valores muito mais baixos do que os respetivos limites inferiores da reta de calibração e atendendo a que a gama de trabalho foi validada com sucesso por diferentes testes estatísticos, decidiu-se não alterar a gama de trabalho de nenhum HAA.

Conclui-se que os limites de quantificação conseguidos neste trabalho através da razão Sinal/Ruído são valores inferiores aos limites referidos pelas entidades *US EPA*, *WHO* e *ERSAR*:

- O somatório das concentrações dos 5 HAAs nos primeiros pontos das reta de calibração apresenta um valor de 40 µg.L⁻¹, que é inferior ao valor de referência de 60 µg.L⁻¹ exigido pela *US EPA*;
- O somatório das concentrações de MCA, DCA e TCA dos primeiros pontos das reta de calibração apresenta um valor de 30 µg.L⁻¹, que é inferior ao valor de referência proposto pela *ERSAR* de 100 µg.L⁻¹;

- As concentrações do MCA, DCA e TCA nos primeiros pontos das reta de calibração obtidas neste trabalho são 20, 5 e 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respetivamente, sendo compatíveis com os valores de referência da WHO: 20, 50 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respetivamente. Sendo o valor de MCA obtido igual ao valor de referência da WHO faz com que este método analítico não seja adequado para a determinação do MCA caso de futuro exista legislação com o mesmo valor como limite. Para este caso será necessário outro método analítico com limites de quantificação mais baixos.

7.3.3. Razão MRM1/MRM2

Uma forma de identificar a presença de um determinado composto numa amostra é normalmente feita através do seu tempo de retenção no cromatograma obtido. Num analisador MS/MS, a razão do sinal obtido entre as transições MRM1 e MRM2 pode também ser utilizada para confirmar a presença de um determinado composto.

Por este motivo, é importante estudar a variação da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho. Na Tabela 22 apresentam-se os resultados deste estudo.

Tabela 22– Razão MRM1/MRM2 para a gama de trabalho dos 5HAAs

Ácido haloacético	Gama de trabalho ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Média da razão MRM1/MRM2	Coefficiente de variação (%)
DBA	5 - 50	1,82	6,4
DCA	5 - 50	1,54	2,1
MBA	5 - 50	1,35	12,2
MCA	5 - 50	2,81	15,8
TCA	20 - 100	1,09	2,1

Para os 5 HAAs, a variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho é inferior a 25%, que é o limite imposto pelo IAREN para este método analítico. Sendo assim, todos os resultados obtidos encontram-se dentro do critério de confirmação da presença de um determinado composto numa amostra.

7.3.4. Precisão

Como já foi referido no capítulo 5, a precisão do método analítico pode ser avaliada através da repetibilidade dos ensaios referentes em dois diferentes níveis de concentração – o mínimo e o máximo da gama de trabalho – para um número de repetições igual a10. Os resultados apresentam-se na Tabela 23.

Tabela 23 – Repetibilidade para o estudo da precisão com n=10

Ácido haloacético	Concentração Inferior		Concentração Superior	
	C. (µg.L ⁻¹)	CV (%)	C. (µg.L ⁻¹)	CV (%)
DBA	5,0	5,2	50,0	2,1
DCA	5,0	7,0	50,0	3,4
MBA	5,0	20,9	50,0	3,7
MCA	20,0	15,7	100,0	7,8
TCA	5,0	4,3	50,0	2,3

A Tabela anterior permite verificar que os coeficientes de variação apresentam valores aceitáveis abaixo de 10 % para a maioria dos ácidos, com a exceção do MBA e MCA que apresentam valores de 20,9 e 15,7 %, respetivamente.

Para se estabelecer o critério de aceitação da repetibilidade recorreu-se à função de Horwitz para determinar o coeficiente de variação esperado para a gama de concentrações considerada [58].

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \tag{Equação 32}$$

Em que C corresponde à concentração do analito expressa como uma fração adimensional de massa. Por exemplo, para uma concentração de 5 ppb o valor usado na equação anterior é de 5 x 10⁻⁹.

Os valores de CV obtidos a partir da função de *Horwitz* foram de 28,8 % para o MCA e 35,5 % para o MBA.

Para se estabelecer um critério de aceitação recorreu-se à função de taxa de HorRat (*Howitz Ratio*) [58]:

$$HorRat = \frac{CV(\%)_r}{CV(\%)_H} \quad (\text{equação 33})$$

Em que $CV(\%)_r$ corresponde ao coeficiente de variação obtido através da repetibilidade de ensaios e $CV(\%)_H$ corresponde ao valor de coeficiente de variação obtido da função de Horwitz. Nestas condições os valores são normalmente aceites quando entre 0,3 e 1.3 [58]. Os valores obtidos foram de 0,54 para o MCA e de 0,59 para o MBA. Pode-se concluir que todos os valores obtidos experimentalmente são aceitáveis visto estarem dentro dos valores de aceitação.

Com este estudo verificou-se que a repetibilidade era significativamente melhor para a concentração correspondente ao limite superior da gama de trabalho do que do limite inferior. Isto deve-se a que as concentrações mais elevadas são menos sensíveis a pequenas variações que podem acontecer no equipamento, mesmo entre análises sucessivas.

7.4. Análise de amostras e ensaios de recuperação

Após a validação do método analítico procedeu-se à injeção das amostras e à realização dos respetivos ensaios de recuperação.

Foram efetuados 3 ensaios em água da rede pública e 3 ensaios em 3 níveis de fortificação diferentes, tal como descrito em 6.4.2.

Na Tabela 24 apresentam-se os resultados da análise das amostras de água, bem como as percentagens de recuperação e coeficientes de variação dos respetivos níveis de fortificação.

Tabela 24– Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da rede pública.

Ácido haloacético	Nível de fortificação 1		Nível de fortificação 2		Nível de fortificação 3	
	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
DBA	103,3	6,0	109,1	3,5	96,3	2,3
DCA	110,4	3,9	112,1	0,5	95,2	3,7
MBA	75,8	9,4	92,5	5,7	87,9	3,8
MCA	96,8	23,0	83,3	23,0	78,9	4,9
TCA	88,6	4,1	109,0	2,6	96,7	2,0

Verifica-se que os valores de recuperação obtidos apresentam alguma variação ao longo da gama de trabalho, mas estão dentro do critério interno de aceitação do IAREN (100 ± 25%). No caso do MCA os valores de recuperação decrescem ao longo da gama de trabalho, enquanto que no caso do MBA os valores tendem a aumentar um pouco.

a) avaliação de interferentes

Para avaliar se a presença de tiosulfato de sódio ou ácido ascórbico afeta os valores de recuperação acima referidos, executou-se o mesmo tipo de análise em amostras tratadas previamente com tiosulfato de sódio e ácido ascórbico, cujos resultados estão registados nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 25- Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da rede pública com tiosulfato de sódio.

Ácido haloacético	Nível de fortificação 1		Nível de fortificação 2		Nível de fortificação 3	
	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
DBA	106,4	3,0	89,9	2,2	97,0	1,6
DCA	113,5	4,7	85,4	3,3	94,3	4,9
MBA	75,7	14,5	74,7	4,5	85,5	5,6
MCA	71,4	13,0	60,4	7,8	75,4	12,6
TCA	111,3	1,2	90,2	1,1	96,4	2,2

Como se pode observar através da Tabela 23, a presença do tiosulfato de sódio na amostra afeta os valores de recuperação do MCA e MBA. Os valores de recuperação daqueles dois ácidos estão mais baixos comparativamente com os valores da amostra sem qualquer tratamento prévio, estando alguns deles abaixo de 75%. Quanto aos outros HAAs, não se observam alterações significativas nos seus valores de recuperação. A variabilidade observada ao longo da gama de trabalho não apresenta nenhuma tendência merecedora de ser salientada.

Tabela 26 - Valores de recuperação média em 3 níveis de fortificação para água da rede pública com ácido ascórbico

Ácido haloacético	Nível de fortificação 1		Nível de fortificação 2		Nível de fortificação 3	
	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
DBA	100,9	0,4	101,4	1,6	104,9	1,2
DCA	87,6	8,7	87,9	2,8	92,5	1,2
MBA	78,93	7,8	87,2	8,7	95,5	4,6
MCA	99,39	26,1	74,6	4,2	67,1	9,3
TCA	95,2	2,1	96,4	1,6	98,2	4,3

No caso da água tratada com ácido ascórbico, os valores de recuperação do MBA estão mais próximos dos obtidos da água sem tratamento. Para o MCA, o valor de taxa de recuperação está próximo do valor esperado para o primeiro nível de fortificação, mas decresce acentuadamente ao longo da gama de trabalho. A presença do ácido ascórbico parece diminuir a taxa de recuperação do DCA nos primeiros níveis de fortificação, mas mantendo-se dentro dos valores aceitáveis.

Não se decifrando nenhuma tendência óbvia nos valores obtidos, decidiu-se executar o teste da análise de variância (ANOVA) para o MCA para tentar avaliar se a presença do ácido ascórbico e do tiossulfato de sódio afeta diretamente o ensaio analítico daquele ácido. Esta análise foi feita diretamente nos valores de concentração obtidos e não nos valores de recuperação.

Inicialmente executou-se a análise de variância a um só fator para cada tipo de tratamento de amostra, com os três níveis de fortificação. Não se obteve resultados conclusivos com esta análise pois, tal como se verificou anteriormente, não há homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho. Executou-se de seguida a análise de um só fator para cada nível de fortificação, com os três tipos de tratamento da amostra. Nas Tabelas 27, 28 e 29 apresentam-se os resultados da análise de variância para os níveis de fortificação 1, 2 e 3, respetivamente.

Tabela 27– Resultado da análise de variâncias para o primeiro nível de fortificação do ensaio com o MCA.

Anova: um só fator

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Amostra não tratada	3	58,07	19,36	11,73
Amostra c/ tiossulfato	3	42,84	14,28	2,72
Amostra c/ ácido asc	3	59,63	19,88	14,83

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc	valor P	F crítico
Entre grupos	57,37	2	28,68	2,94	0,13	5,14
Dentro de grupos	58,56	6	9,76			
Total	115,93	8				

Tabela 28 – Resultado da análise de variâncias para o segundo nível de fortificação do ensaio com o MCA.

Anova: um só fator

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Amostra não tratada	3	99,96	33,32	44,12
Amostra c/ tiossulfato	3	72,48	24,16	3,11
Amostra c/ ácido. asc	3	89,54	29,85	1,06

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc.	valor P	F crítico
Entre grupos	128,35	2	64,18	3,99	0,08	5,14
Dentro de grupos	96,56	6	16,09			
Total	224,92	8				

Tabela 29– Resultado da análise de variâncias para o terceiro nível de fortificação do ensaio com o MCA.

Anova: um só fator

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Amostra não tratada	3	236,60	78,87	13,04
Amostra c/ tiossulfato	3	226,07	75,36	86,58
Amostra c/ ác. asc	3	201,21	67,07	16,65

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc.	valor P	F crítico
Entre grupos	220,09	2	110,05	2,84	0,14	5,14
Dentro de grupos	232,55	6	38,76			
Total	452,64	8				

Os valores de F calculados dos três níveis de fortificação estão abaixo dos respetivos valores de F críticos, para um nível de confiança de 95%, o que é indicativo de que o tipo de tratamento prévio da amostra não influencia a análise do MCA em nenhum nível de fortificação.

Posteriormente, executou-se a análise de variâncias de dois fatores e com repetição para comparar os resultados da amostra sem tratamento prévio com os resultados das amostras com tratamento. Na Tabela 30 apresentam-se os resultados da análise ANOVA para a amostra sem e com tratamento com tiossulfato de sódio para os níveis de fortificação 1 e 2.

Tabela 30– Resultado da análise de variância de dois fatores, com repetição, entre a amostra sem e com tratamento com tiossulfato de sódio para os níveis de fortificação 1 e 2 do ensaio com o MCA.

Anova: fator duplo com repetição

SUMÁRIO	Amostra não tratada	Amostra c/ tiossulfato	Total
Nível 1			
Contagem	3	3	6
Soma	58,07	42,84	100,91
Média	19,36	14,28	16,82
Variância	11,73	2,72	13,51
Nível 2			
Contagem	3	3	6
Soma	99,96	72,48	172,44
Média	33,32	24,16	28,74
Variância	44,12	3,11	44,07
Total			
Contagem	6	6	
Soma	158,03	115,32	
Média	26,34	19,22	
Variância	80,84	31,61	

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc.	valor P	F crítico
Amostra (nível de fortificação)	426,37	1	426,37	27,65	0,00	5,32
Colunas (tratamento da amostra)	152,04	1	152,04	9,86	0,01	5,32
Interações	12,52	1	12,52	0,81	0,39	5,32
Dentro	123,35	8	15,42			
Total	714,28	11				

Analisando os resultados anteriores, verifica-se que, para um grau de confiança de 95%, não há homogeneidade de variâncias entre os dois diferentes tipos de tratamento de amostra ($F_{\text{calc.}} > F_{\text{crítico}}$) como se verifica na secção assinalada, o que

demonstra que a adição do tiosulfato de sódio à amostra provoca interferência no ensaio analítico do MCA, sendo por isso a sua adição à amostra prejudicial para a análise. Tal como já se tinha observado anteriormente, não há homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho. Verificou-se o mesmo resultado ao efetuar a análise com os resultados dos níveis de fortificação 2 e 3.

Na Tabela 31 apresentam-se os resultados da análise para a amostra sem e com tratamento com ácido ascórbico para os níveis de fortificação 1 e 2.

Tabela 31– Resultado da análise de variância de dois fatores, com repetição, entre a amostra sem e com tratamento com ácido ascórbico para os níveis de fortificação 1 e 2 da análise do MCA.

Anova: fator duplo com repetição

SUMÁRIO	Amostra não tratada	Amostra c/ ácido ascórbico	Total
Nível 1			
Contagem	3	3	6
Soma	58,07	59,63	117,70
Média	19,36	19,88	19,62
Variância	11,73	14,83	10,70
Nível 2			
Contagem	3	3	6
Soma	99,96	89,54	189,51
Média	33,32	29,85	31,58
Variância	44,12	1,06	21,69
Total			
Contagem	6	6	
Soma	158,03	149,18	
Média	26,34	24,86	
Variância	80,84	36,18	

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc.	valor P	F crítico
Amostra (nível de fortificação)	429,64	1	429,64	23,96	0,00	5,32
Colunas (tratamento da amostra)	6,54	1	6,54	0,36	0,56	5,32
Interações	11,96	1	11,96	0,67	0,44	5,32
Dentro	143,46	8	17,93			
Total	591,60	11				

Neste caso, a presença de ácido ascórbico não interfere no ensaio analítico do MCA, pois há homogeneidade de variâncias ($F_{calc.} < F_{crítico}$) nos níveis de fortificação 1 e

2, para um nível de confiança de 95%. Todavia, o mesmo não se verificou ao executar a análise de variâncias para os níveis de fortificação 2 e 3 ($F_{\text{calc.}} = 6,85$).

Apesar da análise de variâncias não ter sido suficientemente conclusiva, permite, contudo, salientar as principais tendências da influência da adição do tiosulfato de sódio e do ácido ascórbico às amostras ensaiadas de água da rede pública.

Para o tiosulfato de sódio, a diminuição das taxas de recuperação e a falta de homogeneidade de variâncias poderão indicar que a adição deste reagente influencia o ensaio analítico do MCA e de outros HAAs, sendo por isso a sua adição à amostra prejudicial à análise.

Quanto ao ácido ascórbico, não parece interferir com a análise do MCA nos primeiros níveis de fortificação da amostra, mas a falta de homogeneidade de variâncias em concentrações mais altas indica o contrário.

A variabilidade das taxas de recuperação de certos HAAs, nomeadamente o MCA e MBA ao longo da gama de trabalho poderá indicar ainda a existência de eventuais efeitos de matriz na amostra, mas novos ensaios de quantificação baseados no método da adição de solução padrão seriam necessários para avaliar a existência de tais efeitos.

b) Análise a amostras reais

Foram analisadas amostras da rede pública de abastecimento de água de Matosinhos.

Tal como nos ensaios de recuperação foram analisadas amostras sem tratamento prévio, mas também amostras com adição de tiosulfato de sódio e ácido ascórbico.

Os resultados obtidos na determinação dos ácidos haloacéticos para as amostras da rede pública de abastecimento de água de Matosinhos apresentam-se na Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados da análise das amostras provenientes de Matosinhos

Amostra	Concentração (µg.L ⁻¹)				
	MCA	MBA	DCA	DBA	TCA
Água de rede pública	<20	<5	<5	<5	8,12
Água c/ tiosulfato de sódio	<20	<5	<5	<5	7,49
Água com ácido ascórbico	<20	<5	<5	<5	7,19

Em relação a todas as amostras analisadas apenas foi observado a presença do TCA acima do limite de quantificação do método de ensaio, mas que não ultrapassou nenhum valor de referência imposto pelas entidades *US EPA*, *WHO* e *ERSAR*. Em todas as amostras analisadas os restantes compostos apresentaram valores inferiores aos limites de quantificação estabelecidos neste método de ensaio.

A variação do teor de TCA poderá ser devido ao facto das amostras terem sido recolhidas e analisadas em dias diferentes e não devido ao tipo de tratamento a que as amostras foram sujeitas, todavia as diferenças não significativas.

8. Conclusões e perspetivas futuras

No presente trabalho desenvolveu-se, implementou-se e validou-se um método de análise de ácidos haloacéticos por UHPLC, com deteção por espectrometria de massa (UPLC-ESI-MS/MS), em amostras de água da rede pública.

A otimização das condições operacionais da cromatografia e do funcionamento do detetor permitiu desenvolver um método seletivo de elevada sensibilidade, em que todos os HAAs ensaiados são analisados em 11 minutos e sem necessidade de concentrar a amostra.

Em termos de validação do método, os resultados provenientes dos diferentes testes realizados cumpriram, de uma maneira geral, os requisitos de satisfação impostos pelos critérios internos de aceitação, pelo que se pode afirmar que o método se encontra validado para os principais parâmetros de mérito. Os estudos de validação realizados permitiram obter gamas de trabalho lineares entre 5 - 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o MBA, DBA, DCA e TCA e 20 - 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o MCA, correspondendo a ajustes lineares com coeficientes de correlação superiores a 0,995. Também ultrapassou com sucesso os testes de análise de resíduos, áreas normalizadas, Mandel e Rikilt.

O somatório das concentrações dos 5 HAAs nos primeiros pontos da reta de calibração apresenta um valor de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que não excede os valores de referência das entidades: *US EPA* (5HAAs < 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$), *WHO* (MCAA < 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$; DCAA < 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$; TCAA < 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e *ERSAR* (HAAs3 < 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

A repetibilidade é aceitável para a maioria dos haloácidos, apresentando um coeficiente de variação inferior a 10 %. No caso do MCA e MBA, os coeficientes são mais elevados (15, 7 % e 20,9% respetivamente), mas continuam abaixo dos valores previstos pela função de *Horwitz*. No que diz respeito à razão de confirmação, o coeficiente de variação foi inferior a 25 % para todos dos HAAs.

Os ensaios de recuperação em amostras reais demonstraram que certos HAAs, mais acentuadamente no caso do MCA e MBA apresentam variabilidade de taxa de recuperação ao longo da gama de trabalho, mas mantendo-se dentro dos níveis de aceitação. O mesmo se verificou com a avaliação de interferentes, em particular da presença de tiosulfato de sódio e ácido ascórbico nas amostras de água da rede pública. Este facto poderá indicar a existência de efeitos de matriz na amostra. Será necessário de futuro avaliar a existência de efeitos de matriz, isto pode ser feito por exemplo efetuando retas de calibração pelo método da adição de solução padrão. Caso

se verifique a existência de efeitos de matriz o método analítico terá que ser alterado de modo a eliminar estes efeitos. Isto pode ser feito executando a análise pelo método de adição de solução padrão ou efetuar a concentração prévia da amostra (ex: extração em fase sólida, SPE).

A metodologia desenvolvida foi aplicada na determinação dos HAAs em amostras reais de água para consumo humano (rede pública de abastecimento de água de Matosinhos). Os resultados obtidos demonstram que a presença de HAAs é vestigial para a maioria dos analitos em estudo, onde as concentrações apresentam valores inferiores aos exigidos pelas entidades *US EPA*, *WHO* e *ERSAR*. As amostras analisadas, que foram testadas com e sem adição de tiosulfato de sódio ou ácido ascórbico, apresentaram concentrações de TCA entre 7,19 – 8,12 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que não supera os valores de referência das entidades já referidas.

Estudos realizados anteriormente no IAREN mostraram que os halometanos, compostos com um mecanismo de formação idêntico ao dos ácidos haloacéticos, continuam a formar-se após o momento da amostragem. Os mesmos estudos revelaram que a neutralização do cloro residual no momento da amostragem era conseguida com sucesso pela adição de tiosulfato de sódio ou ácido ascórbico. Como trabalho futuro, sugere-se a realização de um estudo semelhante aplicado agora aos ácidos haloacéticos.

Referências Bibliográficas

1. ERSAR, Controlo de qualidade da água para consumo humano. *Relatório Anual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal*, 2016.
2. Johnson, M.; Ratnayaka, D.; Brandt, M., *Twort's water supply*. Elsevier Ltd.: Burlington, 2009.
3. World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality*. 4 ed.; Geneva, 2011.
4. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants> acedido em Janeiro 2017.
5. ERSAR, Especificação técnica para a certificação do produto água para consumo humano. *Recomendação ERSAR n.º 2*, 2011.
6. Prieto-Blanco, M. C.; Alpendurada, M. F.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D.; Machado, S.; Gonçalves, C., Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **2012**, *94*, 90-98.
7. U S Environmental Protection Agency, EPA Method 552.1, Revision 1.0. EPA/600-R-92/129, (Suppl. II), 1992.
8. U S Environmental Protection Agency, EPA Method 552.2, Revision 1.0. EPA/600-R-95/131, (Suppl. III), 1995.
9. U S Environmental Protection Agency, EPA Method 552.3, Revision 1.0, EPA-815-B-03-002, 2003.
10. <http://www.iaren.pt/> acedido em Fevereiro 2017
11. ERSAR, A qualidade da água na torneira, 2013.
12. Organização Mundial de Saúde, Desinfecção da Água, *Gabinete Regional para a Europa: OMS*, 1996.
13. Martins, T.; Sistemas de Abastecimento de Água para Consumo Humano, *Bragança: IPB*, 2014.
14. www.epal.pt acedido em Janeiro 2017

15. <http://www.aguasdocentro.pt/index.asp>. Acedido em Janeiro 2017.
16. Gray N.; Drinking Water Quality - Problems and Solutions. *John Wiley & Sons*; 1994.
17. Gaur, R. C.; Basic Environmental Engineering, *New Age International Publishers*, 2008.
18. Decreto lei nº306/2007 de 27 de Agosto.
19. Penetra A, Cardoso V. Subprodutos de desinfecção da água para consumo Humano: Monitorização no sistema de abastecimento de água da EPAL. 2011.
20. IRAR, Desinfecção da água destinada ao consumo humano. *Recomendação IRAR nº5/2007*, 2007.
21. Deborde, M.; von Gunten, U., Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research* **2008**, 42 (1–2), 13-51.
22. U. S. EPA, , Alternative Desinfectantes and Oxidants Guidance Manual. 1999.
23. Pereira, D. Detecção de subprodutos da desinfecção com cloro em água dessalinizada. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.
24. Paull, B.; Barron, L., Using ion chromatography to monitor haloacetic acids in drinking water: a review of current technologies. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1046 (1-2), 1-9.
25. Zwiener, C.; Richardson, S. D., Analysis of disinfection by-products in drinking water by LC–MS and related MS techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, 24 (7), 613-621.
26. Jo, W. K.; Kwon, K. D.; Dong, J. I.; Chung, Y., Multi-route trihalomethane exposure in households using municipal tap water treated with chlorine or ozone-chlorine. *Sci Total Environ* **2005**, 339 (1-3), 143-52.
27. Caro, J.; Serrano, A.; Gallego, M., Direct screening and confirmation of priority volatile organic pollutants in drinking water. *J Chromatogr A* **2007**, 1138 (1-2), 244-50.
28. Harman, M.; Rumsby, P.; Kanda, R. *Evaluation of Haloacetic Acid Concentrations in Treated Drinking Water*, Defra Drinking Water Inspectorate: 2011.

29. Rodriguez, M. J.; Serodes, J. B.; Levallois, P., Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system. *Water Res* **2004**, 38 (20), 4367-82.
30. Baribeau, H.; Singer, P. C., *Formation and Decay of Disinfection By-Products in the Distribution System*. AwwaRF: 2006.
31. Richardson, S. D., Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *European Journal of Cancer* **2003**, 39 (18).
32. Andrews, J. E.; Nichols, H. P.; Schmid, J. E.; Mole, L. M.; Hunter, E. S., 3rd; Klinefelter, G. R., Developmental toxicity of mixtures: the water disinfection by-products dichloro-, dibromo- and bromochloro acetic acid in rat embryo culture. *Reprod Toxicol* **2004**, 19 (1), 111-6.
33. Solomons G, Fryhle C. Organic Chemistry ninth edition: *Wiley*; 2008.
34. Srinivasan, K., R. Lin e C. Pohl, *Recent Advances in Analysis of Haloacetic Acids by Two-Dimensional Matrix Elimination Ion Chromatography*, USA: Dionex Corporation.
35. Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment., Guideline Technical Document-Haloacetic Acids. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*, Canada, 2008.
36. Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto
37. Decreto-Lei 103/2010 de 24 de Setembro
38. Decreto-Lei 243/01 de 5 de Setembro
39. Chen, C.-Y.; Chang, S.-N.; Wang, G.-S., Determination of Ten Haloacetic Acids in Drinking Water Using High-Performance and Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, 47, 67-74.
40. Meng, L.; Wu, S.; Ma, F.; Jia, A.; Hu, J., Trace determination of nine haloacetic acids in drinking water by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (29), 4873-4876.
41. Luo, Q.; Wang, D.; Wei, Z.; Wang, Z., Optimized chromatographic conditions for separation of halogenated acetic acids by ultra-performance liquid chromatography–

electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1277, 26-34.

42. Duan, J.; Li, W.; Si, J.; Mulcahy, D., Rapid determination of nine haloacetic acids in water using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in multiple reactions monitoring mode. *Analytical Methods* **2011**, 3 (7), 1667.

43. Collins, C. H., Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 7-20.

44. Maldaner, L.; Jardim, I., O estado da arte da cromatografia líquida de ultra-eficiência. *Química Nova* **2009**, 32, 214-222.

45. Srivastava, B.; Sharma, B. K.; Baghel, U. S., Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* **2010**, 2, 19-25.

46. McNair M, Miller J. Basic Gas Chromatography. Second Edition: *John Wiley & Sons, Inc*; 2009.

47. New, L.-S.; Chan, E. C. Y., Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) Column Chemistries for the UPLC–MS–MS Analysis of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Ophthalmic Acid in Mouse Liver and Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science* **2008**, 46, 209-214.

48. http://www.waters.com/waters/en_GB/HSS-%28High-Strength-Silica%29-Technology/nav.htm?cid=134618105&locale=en_GB Acedido em Dezembro 2016

49. SOQUÍMICA, Espectrometria de Massa de Electrospray, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. **2001** 80, 36-42,.

50. Gabelica, V.; De Pauw, E., Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources. *Mass Spectrom Rev* **2005**, 24 (4), 566-87.

51. Kostianen, R.; Kauppila, T. J., Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2009**, 1216 (4), 685-99.

52. Hoffmann, Edmond de; Stroobant, Vincent. Mass Spectrometry – Principles and Applications. 3rd ed. *John Wiley & Sons Ltd*, 2007.

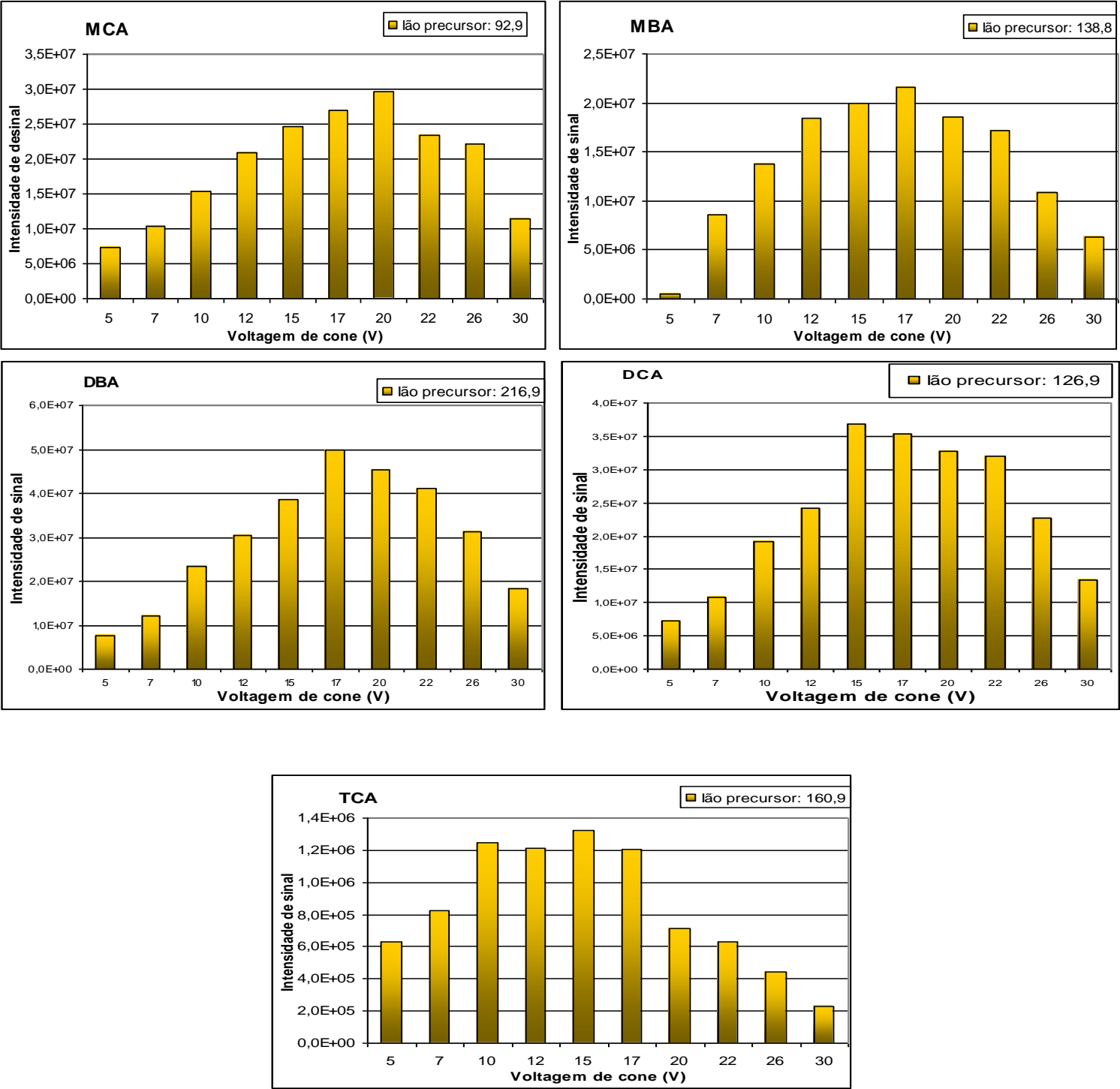
53. Relacre, *Guia Relacre 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Fevereiro 2000.

54. IPAC, Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos. OGC007, 2007.
55. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*. 7th ed.; Craig Bleyer. 2007.
56. Grumbach, E.S., *Beginners guide to UPLC - Ultra-Performance Liquid Chromatography*., Milford: Waters Corporation. 2012
57. Avó, R. Determinação de pesticidas por cromatografia gasosa com deteção por captura eletrónica (GC-ECD) e por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2015.
58. Rivera, C.; Rodríguez, R. *Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory*, Bufete de ingenieros industriales, S.C.: Chihuahua Mexico.

Anexos

Anexo I Otimização da voltagem de cone

Apresenta-se de seguida os resultados da otimização da voltagem de cone do espectrómetro de massas

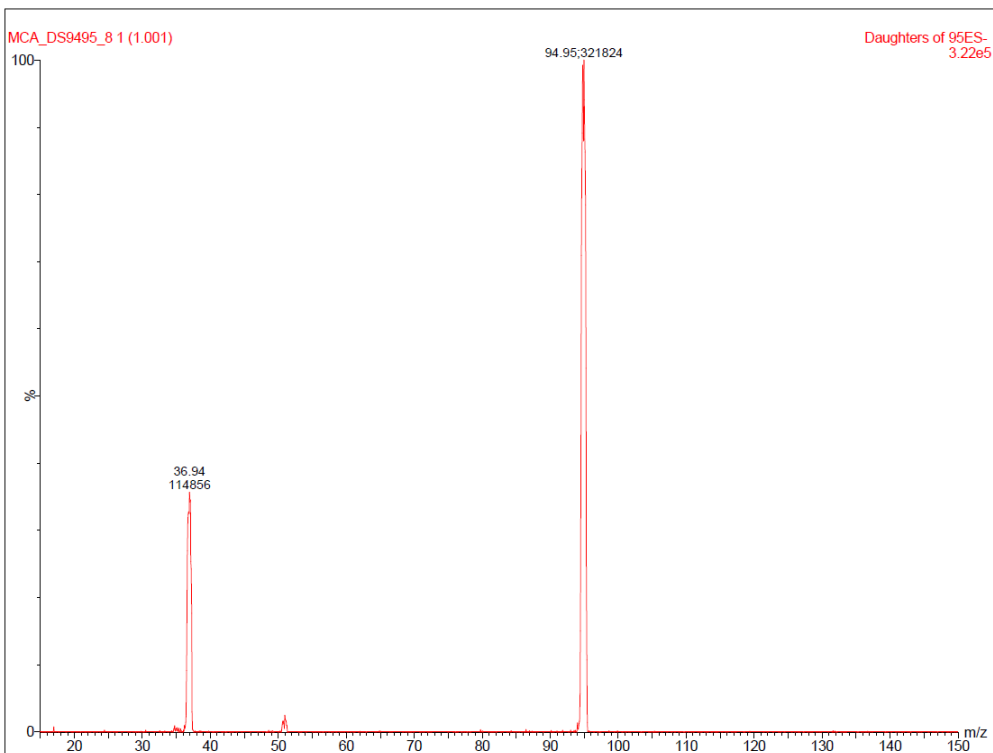
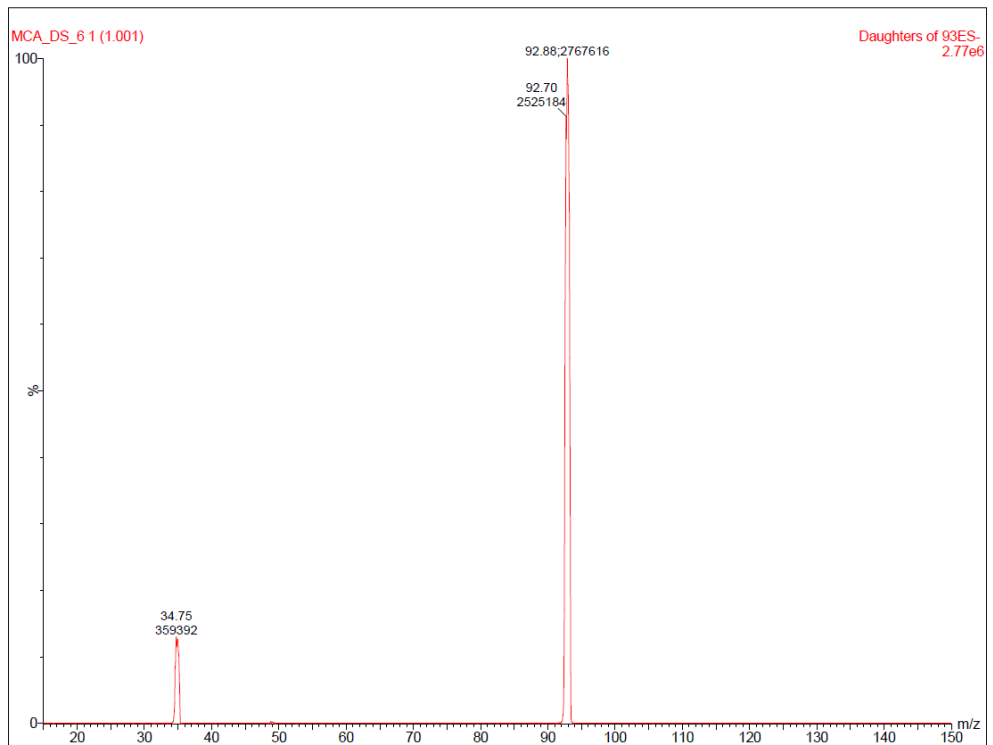


Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da voltagem de cone (V) para o ião precursor de cada composto.

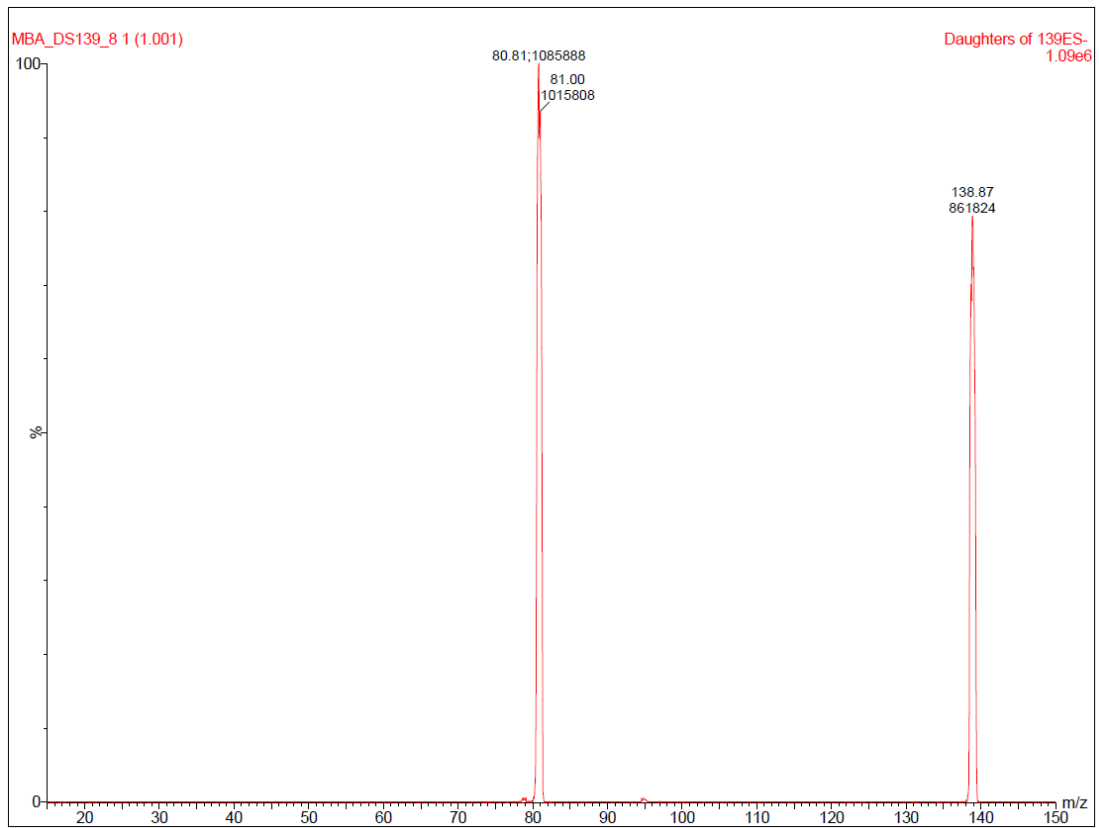
Anexo II Espectros de massa dos iões seleccionados para o modo de MRM

Apresentam-se de seguida os espectros de massa correspondentes à otimização das condições de MRM dos 5HAA.

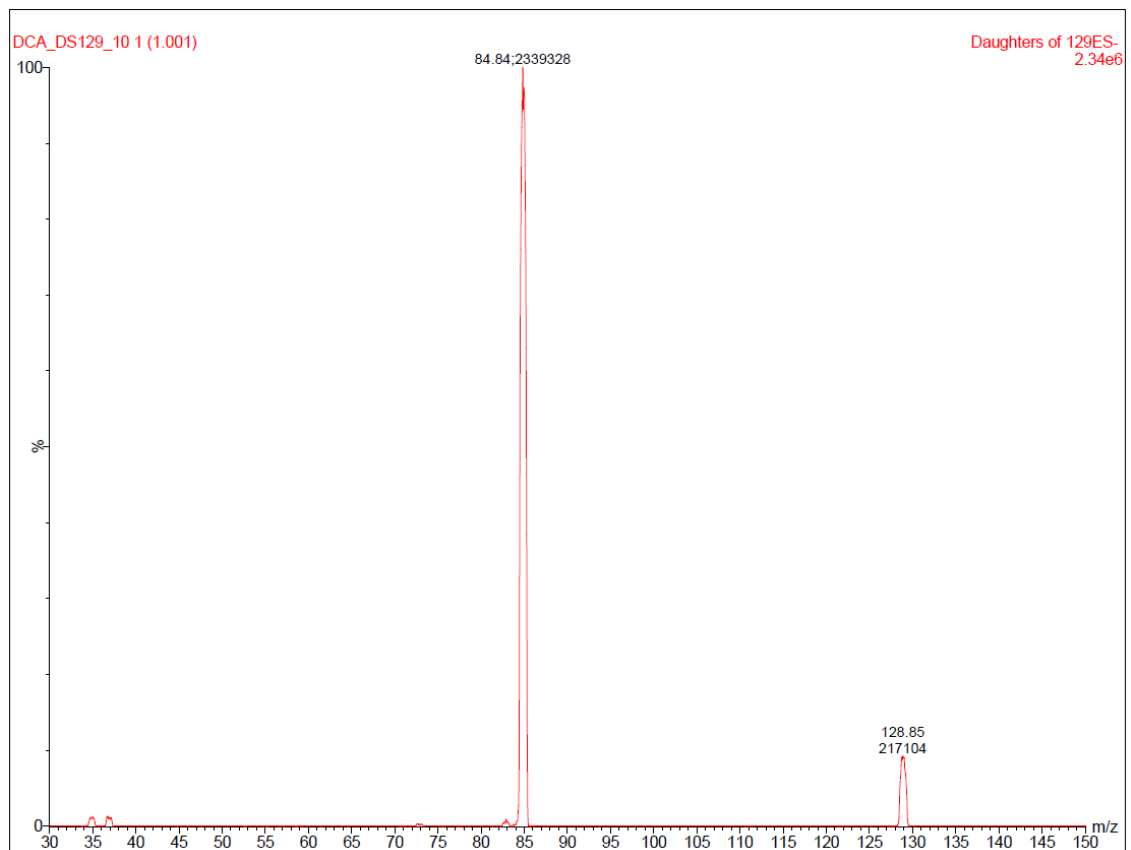
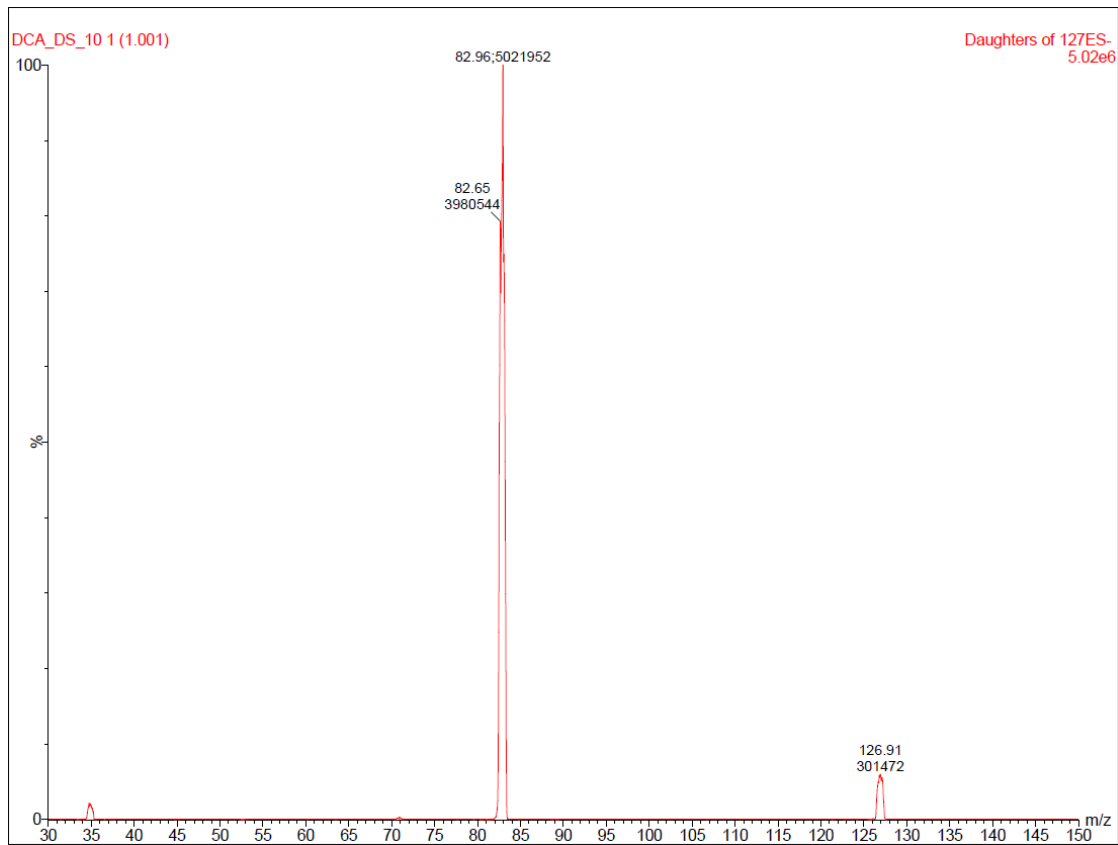
MCA



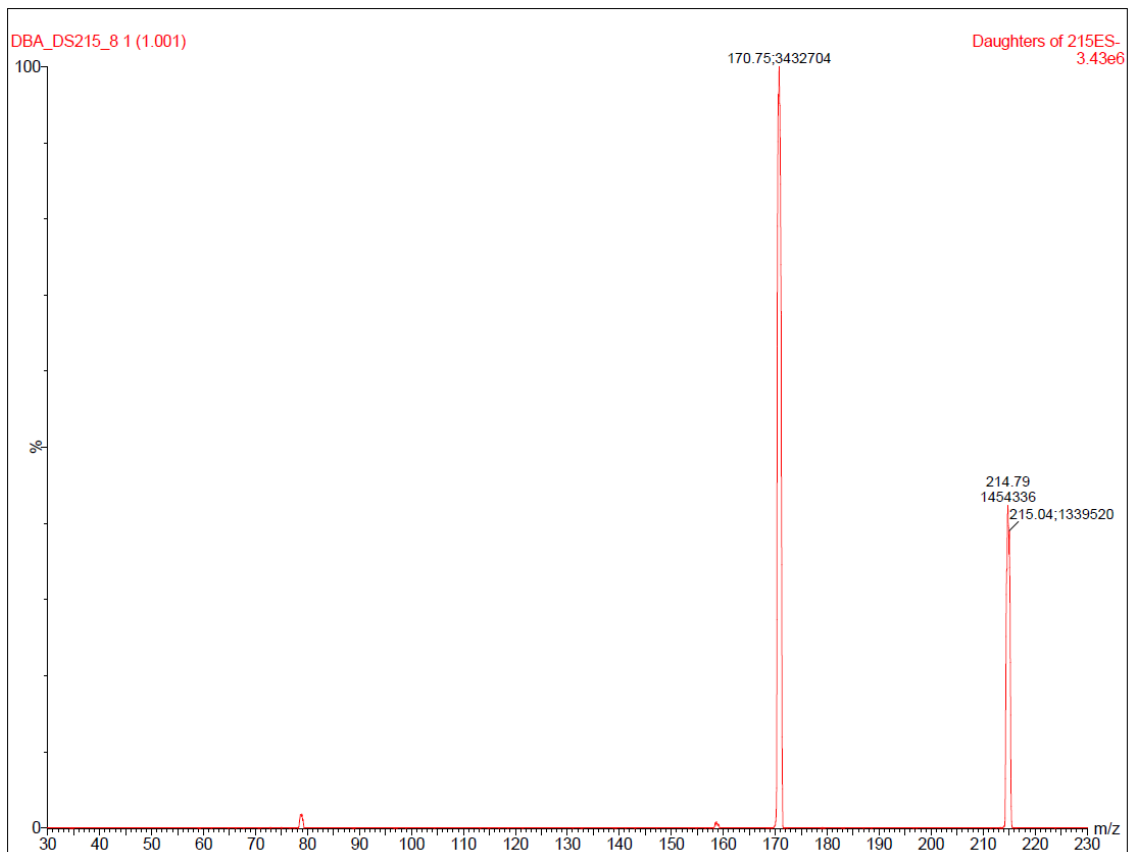
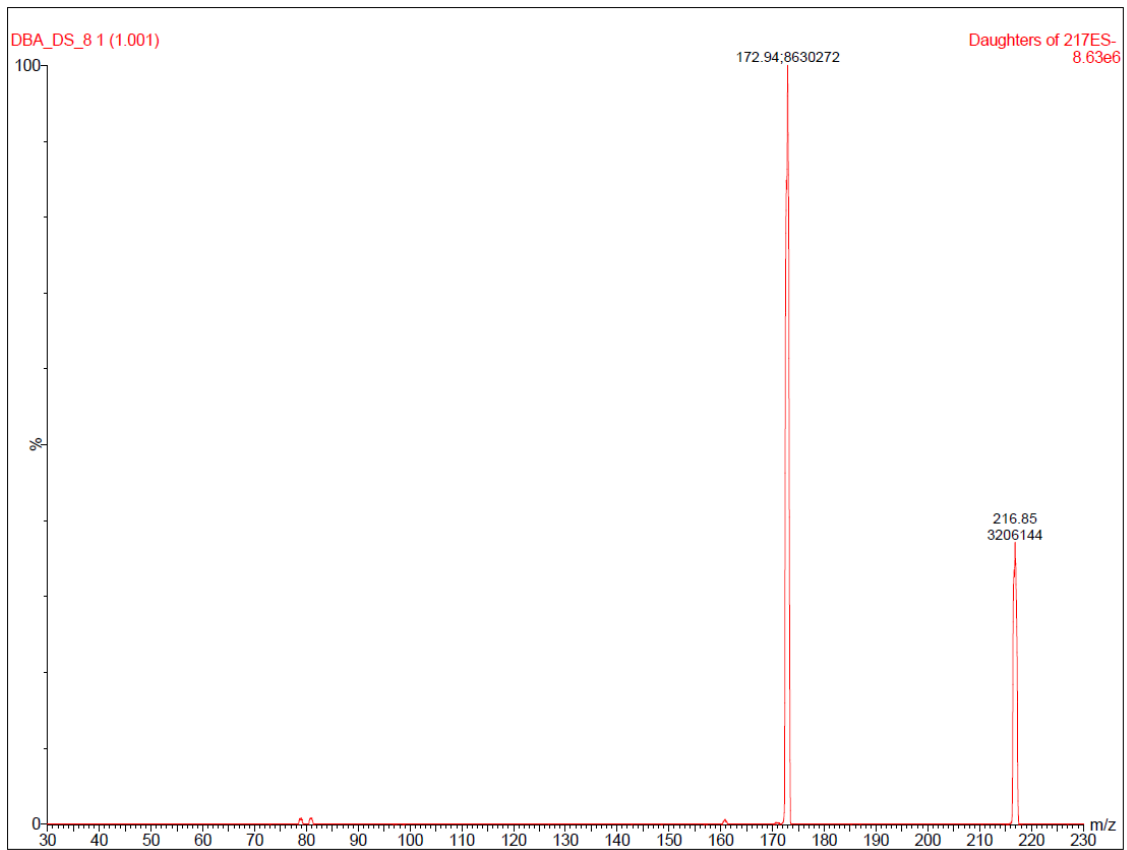
MBA



DCA



DBA



TCA

